

Charakterisierung Patatin-ähnlicher Proteine des Lungenpathogens
Legionella pneumophila

D i s s e r t a t i o n

Zur Erlangung des akademischen Grades

d o c t o r r e r u m n a t u r a l i u m

(Dr. rer. nat.)

Im Fach Biologie

Eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Dipl. Biol. Philipp Auraß

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. Dr. h.c. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. Lutz-Helmut Schön

Gutachter: 1. Prof. Dr. E. Schneider
2. Prof. Dr. B. Hube
3. PD Dr. K. Heuner

Tag der mündlichen Prüfung: 24. Februar 2009

Die vorliegende Arbeit wurde im Zeitraum von Dezember 2004 bis Juli 2008 in der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. Antje Flieger (NG 5, „Pathogenese der Legionelleninfektion“) am Robert Koch-Institut angefertigt.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbst angefertigt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe. Ich versichere, dass ich diese Arbeit weder in dieser noch in einer anderen Form bei einer anderen Prüfungsbehörde eingereicht habe.

Wernigerode, den

Philipp Auraß

Abkürzungsverzeichnis

1,2-DG	1,2-Dipalmitoylglycerol
1-MPG	Monopalmitoylglycerol
As	Aminosäuren
BCYE agar	<i>buffered charcoal yeast extract agar</i>
bp	Basenpaare
BYE	<i>buffered yeast extract</i> Flüssigmedium
CFU	<i>colony forming units</i> / Koloniebildende Einheiten
DPPC	Dipalmitoylphosphatidylcholin
DPPG	Dipalmitoylphosphatidylglycerol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
FFA	Freie Fettsäuren
H ₂ O bidest	Doppelt destilliertes, steriles Wasser
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalaktopyranosid
Km ^R	Kanamycin-Resistenz Gen Kassette
LB	Luria Bertani Medium
Log	Logarithmus
Lpc	<i>locus tag L. pneumophila</i> Corby
Lpg	<i>locus tag L. pneumophila</i> Philadelphia-1
Lpl	<i>locus tag L. pneumophila</i> Lens
LPLA	Lysophospholipase A
Lpp	<i>locus tag L. pneumophila</i> Paris
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
MPLPC	Monopalmitoyl-Lysophosphatidylcholin
MPLPG	Monopalmitoyl-Lysophosphatidylglycerol
OD	Optische Dichte
ORF	Offener Leserahmen
PHB	Poly- β -Hydroxybutyrat
PLA	Phospholipase A
PLP	<i>patatin-like protein</i> / Patatin-ähnliches Protein
PVDF	Polyvinyliden Fluorid
rpm	<i>rotation per minute</i> / Umdrehungen je Minute
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion
SDS PAGE	Natriumdodezylsulfat Polyacrylamid Gel Elektrophorese
TLC	<i>thin layer chromatografie</i> / Dünnschicht Chromatografie

Inhaltsverzeichnis

Erklärung.....	III
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	2
2.1 Die Rolle von <i>Legionella pneumophila</i> als Krankheitserreger	2
2.2 Biologie von <i>Legionella pneumophila</i>.....	2
2.2.1 Erregerreservoir und Anzucht	2
2.2.2 Der Generationszyklus und intrazelluläre Replikation von <i>L. pneumophila</i>	4
2.3 Virulenzfaktoren von <i>L. pneumophila</i>	7
2.3.1 Proteinsekretionssysteme von <i>L. pneumophila</i> und ihre Rolle für die Virulenz.....	7
2.3.2 Das <i>L. pneumophila</i> Dot/Icm Sekretionssystem	8
2.3.3 Das <i>L. pneumophila</i> Lsp Sekretionssystem.....	9
2.4 Eigenschaften von Phospholipasen A	9
2.4.1 Phospholipasen als bakterielle Pathogenitätsfaktoren.....	11
2.4.2 Phospholipasen A von <i>L. pneumophila</i>	12
2.5 Patatin und Patatin-ähnliche Phospholipasen.....	14
2.5.1 Charakteristika von Patatin und eukaryontischen Patatin-ähnlichen Proteinen.....	14
2.5.2 Bakterielle Patatin-ähnliche Proteine und deren Charakteristika.....	16
2.5.3 Virulenzbezug bakterieller Patatin-ähnlicher Proteine, <i>P. aeruginosa</i> ExoU.....	18
2.5.4 Patatin-ähnliche Proteine von <i>L. pneumophila</i>	19
2.5.5 Das Patatin-ähnliche Protein PatA/VipD von <i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1.....	21
2.6 Ziel der Arbeit	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Laborausstattung	23
3.1.2 Spezielle Materialien.....	23
3.1.3 Verwendeter Chemikalien.....	24
3.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen.....	27
3.1.5 Verwendete Bakterien und Zellen.....	28
3.1.6 Verwendete Kulturmedien	29
3.1.7 Antibiotika.....	30
3.1.8 Verwendete Enzyme	31

3.1.9	Verwendete Kits	32
3.1.10	Verwendete Antikörper	32
3.1.11	Verwendete Vektoren	33
3.1.12	Verwendete Oligonukleotide	33
3.1.13	Verwendete Standards	35
3.1.14	Generierte Plasmide	36
3.1.15	Generierte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)	37
3.1.16	Verwendete Software	39
3.2	Methoden.....	40
3.2.1	Anzucht von Bakterien	40
3.2.1.1	<i>Legionella pneumophila</i>	40
3.2.1.2	<i>Escherichia coli</i>	40
3.2.2	Anzucht von Makrophagen, Epithelzell- und <i>Acanthamoeba</i> Zellkulturen	41
3.2.3	Grundlegende Nukleinsäure-Techniken	41
3.2.3.1	Isolierung genomischer DNA	41
3.2.3.2	Isolierung extrachromosomaler DNA	42
3.2.3.3	RNA-Isolierung	42
3.2.3.4	Restriktionsverdau von Nukleinsäuren	42
3.2.3.5	Ligation von DNA-Fragmenten	42
3.2.3.6	Polymerase Kettenreaktion	43
3.2.3.7	Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion	43
3.2.3.8	Inverse PCR	44
3.2.3.9	Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion	44
3.2.3.10	Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA	45
3.2.4	Herstellung und Transformation elektrokompenter <i>E. coli</i> und <i>L. pneumophila</i>	46
3.2.4.1	Herstellung elektrokompenter <i>E. coli</i>	46
3.2.4.2	Herstellung elektrokompenter <i>L. pneumophila</i>	46
3.2.4.3	Transformation von DNA	46
3.2.5	Mutagenese von <i>L. pneumophila</i>	47
3.2.6	Elektrophoresen und Western Blot	47
3.2.6.1	Nukleinsäure-Gel-Elektrophorese	47
3.2.6.2	SDS-PAGE	48
3.2.6.3	Western Blot	48
3.2.6.4	Immundetektion geblotteter Proteine	48
3.2.7	Expression und Aufreinigung von Proteinen	49
3.2.7.1	Proteinexpression und Zellaufschluss	49
3.2.7.2	Aufreinigung von His ₆ markierten Proteinen	49
3.2.8	Nachweis von PLA	49
3.2.8.1	Gewinnung von bakteriellen Zellpelletlysaten und Kulturüberständen	49
3.2.8.2	Gewinnung von A549 und U937 Zelllysaten	50
3.2.8.3	Verdau von Lipidsubstraten	50
3.2.8.4	Messung der freien Fettsäuren	51
3.2.8.5	Lipidextraktion und Dünnschichtchromatografie	52

3.2.8.6 Hämolyseassays	52
3.2.9 Zytotoxizitätstest von PatA, Vitalitätsbestimmung von U937 Makrophagen.....	53
3.2.10 Intrazelluläre Infektion von <i>A. castellanii</i> , U937 Makrophagen und A549	
Epithelzellen	53
3.2.10.1 Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit von <i>L. pneumophila</i> in <i>A. castellanii</i>	53
3.2.10.2 Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in U937 und A549 Zellen....	54
3.2.10.3 Bakterienzahlbestimmung mit dem „Whitley Spiral Plater“	54
3.2.11 Herstellung und Präadsorption von Antikörpern	55
3.2.11.1 Herstellung monoklonaler PatA spezifischer Antikörper	55
3.2.11.2 Herstellung polyklonale Eidotterantikörper	55
3.2.11.3 Präadsorption polyklonaler Antikörper.....	56
3.2.12 Transfektion von A549 Zellen	56
3.2.13 Immunfluoreszenzmikroskopie.....	56
3.2.13.1 Fixierung von Zellen und Bakterien.....	56
3.2.13.2 Immunfärbung von Präparaten.....	57
3.2.13.3 NileRed Färbung intrazellulärer Lipideinschlüsse.....	57
3.2.14 Elektronenmikroskopie	58
3.2.15 Scatterscreen.....	58
3.2.15.1 Transposon Mutagenese.....	58
3.2.15.2 Identifizierung der Transposon-Insertionsorte	59
3.2.15.3 Screen der Tn5 Mutanten im Scattertestverfahren.....	60
3.2.16 FTIR Messungen des PHB Gehalts.....	61
4. Ergebnisse	62
4.1 Patatin ähnliche Proteine von <i>L. pneumophila</i>	62
4.1.1 <i>In silico</i> Analyse von <i>L. pneumophila patA</i>	63
4.1.1.1 Sequenzhomologien von <i>L. pneumophila</i> PatA und <i>P. aeruginosa</i> ExoU	65
4.1.2 Expressionsanalysen der <i>L. pneumophila</i> PLP Gene	67
4.1.3 Rekombinante Expression der <i>L. pneumophila</i> PLP in <i>E. coli</i>	69
4.1.4 Phänotypische Charakterisierung von <i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1 PatA	71
4.1.4.1 <i>L. pneumophila patA</i> Insertionsmutanten vermehren sich in Laborkultur.....	71
4.1.4.2 Lipolytische Aktivität von <i>L. pneumophila patA</i> Mutanten und Überexpressionsklonen	72
4.1.4.3 <i>L. pneumophila patA</i> Mutanten besitzen reduzierte hämolytische Aktivität ...	73
4.1.4.4 Untersuchung der intrazellulären Vermehrung von <i>L. pneumophila patA</i> Mutanten	74
4.1.5 Lipolytische Aktivität von rekombinant aufgereinigtem PatA und PatAS73A	77
4.1.5.1 Lipolytische Aktivität von rekombinant aufgereinigtem <i>E. coli</i> RssA und RssAS41A	79
4.1.5.2 Wird PatA durch bakterielle oder wirtszelleigene Faktoren prozessiert?	80
4.1.5.3 Zytotoxizität von rekombinant aufgereinigtem PatA.....	83
4.1.6 Lokalisation von PatA in Wirtszellen	84

4.1.6.1 Lokalisation von PatA in transfizierten Epithelzellen.....	85
4.1.6.2 Lokalisation von PatA in <i>L. pneumophila</i> und in infizierten Wirtszellen.....	90
4.2 Suche und Identifizierung neuer <i>Legionella</i> Gene für die Wirtszellkolonisation	92
4.2.1 Beobachtungen zum <i>Scatter</i> Phänotyp.....	92
4.2.2 Etablierung des <i>Scatter</i> -Phänotyps als Mittel zum Hochdurchsatz-screenen auf Wirtszellkolonisationsdefekte von <i>L. pneumophila</i>	96
4.2.3 Herstellung einer <i>L. pneumophila</i> Tn5 Insertionsmutanten-Klonbank.....	96
4.2.4 Screen der <i>L. pneumophila</i> Klonbank auf Kolonisationsdefekte.....	97
4.2.5 Evaluierung der Scattermutanten im quantitativen Infektionsmodell.....	98
4.2.6 Identifizierung der Tn5 Insertionsorte im Chromosom von Scattermutanten.....	102
4.2.6.1 Übersicht der identifizierten Gene	103
4.2.7 Charakterisierung des Lokus <i>lpg2316 (bdhA)/lpg2317 (patD)</i>	108
4.2.7.1 Untersuchung der PHB Speicher in <i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1 Wildtyp und der <i>lpg2316/17</i> Mutante.....	110
4.2.7.2 Untersuchungen zur lipolytischen Aktivität von <i>L. pneumophila</i> Philadelphia-1 <i>lpg2316/17</i> Mutanten.....	116
4.2.7.3 Komplementation des intrazellulären Vermehrungsdefekts von <i>L. pneumophila lpg2316/17</i> Mutanten.....	117
5. Diskussion	119
5.1 Untersuchung der Patatin-ähnlichen Proteine von <i>Legionella pneumophila</i>	119
5.1.1 Lipolytische Aktivität.....	119
5.1.2 Lokalisation und Funktion von PatA für das Bakterium bzw. bei der Infektion von Wirtszellen.....	122
5.1.2.1 Die Rolle der lipolytischen Aktivität	122
5.1.2.2 Die Rolle von PatA-Lokalisation und C-terminaler Extension.....	123
5.2 Suche und Identifizierung neuer <i>Legionella</i> Wirtszellkolonisationsgene	126
5.2.1 Zweck und Entwicklung eines neuen Detektionssystems für Wirtszell- kolonisationsgene.....	126
5.2.2 Die Identifizierung vieler etablierter Virulenzgene evaluiert das Testsystem als funktionell.....	128
5.2.3 Analyse einer Scattermutante – Charakterisierung des putativen PHB Abbau- Operons <i>lpg2316/17</i>	130
5.2.4 Beispiele weiterer neuer putativer <i>L. pneumophila</i> Kolonisationsgene.....	133
6. Referenzen.....	135
7. Anhang	155
8. Publikationsliste	163
9. Danksagung.....	164

1. Zusammenfassung

Legionella pneumophila ist ein fakultativ intrazellulär replizierendes Bakterium und der Erreger der Legionärskrankheit, einer schweren Pneumonie. Das Typ IVB Dot/Icm Proteinsekretionssystem und dessen Effektoren sind wesentlich an der Virulenz des Bakteriums beteiligt. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Charakterisierung der Patatin-ähnlichen Proteine von *L. pneumophila* - insbesondere von PatA, das vom Dot/Icm Sekretionssystem in Wirtszellen eingeschleußt wird. Die gewonnenen Erkenntnisse leisten einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Vielzahl an lipolytischen Proteinen von *L. pneumophila* und ihren Beitrag zur Pathogenese der Legionärerkrankung.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende wichtigen Ergebnisse erzielt:

- I. Die 11 Patatin-ähnlichen Proteine von *L. pneumophila* zeigen hauptsächlich Lysophospholipase A-Aktivität.
- II. *L. pneumophila* PatA besitzt außerdem eine Phosphatidylglyzerol-spezifische Phospholipase A-Aktivität. Serin-72, welches in ein G-X-S-X-G Lipasemotiv eingebettet ist, ist für die Aktivität des Proteins essentiell.
- III. *L. pneumophila* PatA ist nach Expression in humanen A549 Epithelzellen in der Zytoplasmamembran oder einer damit eng assoziierten Struktur lokalisiert. Für die Lokalisation ist die lipolytische Aktivität des Proteins nicht entscheidend. Die Deletion einer C-terminalen Proteinregion führt zum Verlust der membranständigen Proteinlokalisierung.
- IV. *L. pneumophila* Mutanten, die eine reduzierte Fähigkeit zur Kolonisierung von Amöben besitzen, bilden unter Präsenz von Amöben - im Gegensatz zu Wildtypstämmen - eine Koloniemorphologie aus, die Scattermorphologie genannt wurde.
- V. Auf Basis der Scattermorphologie wurde ein neuartiges Testsystem entwickelt, das es ermöglicht eine grosse Anzahl Transposon-mutagenisierter *Legionella* Klone auf Wirtszell-Kolonisationsdefekte zu überprüfen. Unter Verwendung dieses Tests wurden 119 kolonisationsdefekte Mutanten isoliert und 70 neue putative *Legionella*-Wirtszellkolonisationsgene, darunter zwei Gene von Patatin-ähnlichen Proteinen (*patD* und *patF*), identifiziert.
- VI. *patD* befindet sich in einem Operon mit *bdhA*, das für eine putative 2-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase kodiert. Das Operon spielt eine Rolle im Poly- β -Hydroxybutyrat (PHB) Stoffwechsel des Bakteriums und wird für die Replikation in Wirtszellen benötigt. Die Studie liefert die ersten experimentell fundierten Ergebnisse, die die Bedeutung des PHB-Metabolismus für die Virulenz des Bakteriums belegen.

2. Einleitung

2.1 Die Rolle von *Legionella pneumophila* als Krankheitserreger

Legionellen sind gram-negative, flagellierte Stäbchenbakterien. Charakteristischerweise sind sie in der Lage, sich intrazellulär, also innerhalb infizierter Wirtszellen zu vermehren. Gelangen die Bakterien in die menschliche Lunge können sie die Legionärskrankheit auslösen. Als schwere Form der Lungenentzündung führt diese zu einer lebensbedrohlichen Lungeninsuffizienz. Eine zweite, mildere Verlaufsform der Legionelleninfektion manifestiert sich als respiratorischer Infekt, der selbstlimitierend ist und Pontiac Fieber heisst. Welche der beiden Verlaufsformen zur Ausprägung kommt und ob eine Etablierung des Pathogens und eine Infektion überhaupt erfolgt, hängt von der Quantität der eingeatmeten Bakterien und dem Immunstatus des Betroffenen ab (19,67).

Dem Robert Koch-Institut wurden für das Jahr 2006 insgesamt 571 Fälle von Legionelleninfektionen übermittelt. Dies entspricht einer bundesweiten Inzidenz von 5,9 Erkrankungen pro einer Million Einwohner (Epidemiologisches Bulletin 50/2007). Bei 96,2% der gemeldeten Fälle in denen eine Erregerspeziesangabe erfolgte (76,4% aller gemeldeten Legionellosen), ging die Erkrankung auf eine Infektion mit *Legionella pneumophila* zurück. Nur 3,8% wurden durch andere *Legionella* Spezies verursacht. Dies verdeutlicht, dass Legionellen der Spezies "*pneumophila*" für die Humanmedizin größte Bedeutung besitzen. Die Gattung *Legionella* ist obgleich überaus artenreich, derzeit sind mindestens 51 Arten mit insgesamt 73 Serogruppen bekannt (Epidemiologisches Bulletin 50/2007).

Es ist wahrscheinlich, dass die Zahl der tatsächlich aufgetretenen Legionelleninfektionen die der gemeldeten um ein Vielfaches übersteigt. Nach aktuellen Untersuchungen des Kompetenznetzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien ("CAPNETZ") wird davon ausgegangen, dass in Deutschland 4% aller ambulant auftretenden Pneumonien durch Legionellen verursacht werden. Dies entspräche rund 20.000 Fällen im Jahr, die Legionelleninfektionen zuzuschreiben wären (232).

2.2 Biologie von *Legionella pneumophila*

2.2.1 Erregerreservoir und Anzucht

Legionellen sind weit verbreitete Umweltkeime, deren primäres Reservoir natürliche Süßwasserhabitats sind. Durch ihre komplexen Nährstoffanforderungen sind sie hier jedoch von speziellen Nischen abhängig, die ihr Überleben und ihre Replikation ermöglichen.

Einleitung

Legionellen kommen in der Umwelt als intrazelluläre Parasiten von Protozoen, z.B. von Amöben vor, sowie in Assoziation mit Biofilmen. Obwohl Amöben und andere Protozoen „räuberisch“ leben und sich normalerweise von Bakterien ernähren, sind bestimmte Bakterien, z.B. *Legionella pneumophila* in der Lage, dem Fraßdruck der Amöben zu widerstehen und diese sogar für eigene Zwecke auszubeuten.

Neben der Erschliessung von Nährstoffreserven bietet der intrazelluläre Parasitismus dem Bakterium Schutz vor schädlichen Umwelteinflüssen wie zum Beispiel klimatischen Veränderungen oder vom Menschen vorgenommenen Desinfektionsmassnahmen (23,223). Weiterhin unterstützen Amöben als Vektoren die Ausbreitung von Legionellen, da in ihnen hohe bakterielle Keimzahlen konzentriert vorliegen, was die kollektive Kolonisierung neuer Lebensräume, zum Beispiel der menschlichen Lunge, erleichtert. Gegen Ende der intrazellulären Vermehrung der Legionellen in einer Amöbe findet eine simultane Expression von *Legionella*-Virulenzfaktoren statt, welche die Bakterien nach dem Verlassen der Wirtszelle besonders invasiv und virulent machen und so die Einleitung des nächsten Infektionszyklus erleichtern (43,44,161). Diese wirtszellabhängige Stimulation der *Legionella*-Virulenz manifestiert sich auch klinisch. Legionelleninfektionen verlaufen schwerer, wenn die Bakterien zusammen mit Amöben in die Lunge gelangen (25-27). Die Amöbeninteraktion ist deshalb für *Legionella* eine wichtige Episode des Lebenszyklus, und zwar sowohl für die bakterielle Population in der Umwelt als auch bei der Infektion von Menschen.

Viele Aspekte der Amöbeninfektion in Umwelthabitaten sind der Infektion von menschlichen Zellen sehr ähnlich, was das Studium der Amöbeninteraktion für die klinisch relevante Forschung sehr interessant macht. In beiden Wirtszellen, Amöben und menschlichen Zellen (z.B. Makrophagen), replizieren die Legionellen in einem Legionellenphagosom, welches von Vesikeln, endoplasmatischem Retikulum und Mitochondrien der Wirtszellen umgeben wird und in frühen Stadien nicht mit Lysosomen verschmilzt (siehe 2.2.2) (24,81,107). Die notwendigen bakteriellen Determinanten für die Etablierung der Parasit-Wirt Beziehung sind zu großem Teil in Amöben und menschlichen Zellen identisch. Das gilt zum Beispiel für das Typ IVB Dot/Icm Proteinsekretionssystem (206). Allerdings existieren auch Ausnahmen, das *L. pneumophila* GacA Homolog LetA, *response regulator* des LetA/S Zwei-Komponentensystems, erwies sich als essentiell für die intrazelluläre Vermehrung der Bakterien in *A. castellanii*, jedoch waren *L. pneumophila* *letA* Mutanten durchaus in der Lage, sich wildtypähnlich in Humanmakrophagen zu vermehren (78). Ein zweites Beispiel bildet die *L. pneumophila* Zink-Metalloprotease ProA, die für die intrazelluläre Vermehrung in der

Einleitung

Amöbe *Hartmanella vermiformis* essentiell, für die Replikation in Humanzellen *in vitro* jedoch vernachlässigbar ist (183) (siehe 2.3.1).

Die *Legionella*-Keimzahlen in natürlichen Reservoiren sind in der Regel gering und stellen für den Menschen kein hygienisches Risiko dar. Anders gestaltet sich die Situation in künstlichen, menschengemachten Süßwasserhabitaten wie Rohrsystemen, Klimaanlage, Schwimmbädern oder Zimmerspringbrunnen. Insbesondere innerhalb von Warmwasserleitungssystemen, bei Temperaturen von 25 bis 45°C und Biofilmbewahrung, finden sich ideale Voraussetzungen für die Vermehrung der Bakterien. Laut Trinkwasserverordnung vom 01.01.2003 gilt für öffentliche Gebäude der Grenzwert von <100CFU/100ml (Koloniebildende Einheiten). Regelmässige mikrobiologische Kontrollmaßnahmen in öffentlich zugänglichen Gebäuden, insbesondere solchen, in denen sich typischerweise Risikopatienten aufhalten (Krankenhäuser, Altenpflegeheime), sind deshalb erforderlich und ziehen gegebenenfalls Sanierungs- und Dekontaminationsmassnahmen nach sich.

Legionellen können unter Laborbedingungen unter Verwendung spezieller Medien kultiviert werden. Das Laborkulturmedium enthält Hefeextrakt als Proteinquelle, L-Cystein Hydrochlorid, Eisenphosphat und α -Ketoglutarat (Festmedien enthalten zusätzlich Agar und Aktivkohle). Optimales Wachstum wird bei 35°C und pH 6.9 \pm 0.4 erreicht. Die Generationszeit beträgt unter diesen Bedingungen 4-6 Stunden (60,65,233).

2.2.2 Der Generationszyklus und intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila*

Der Generationszyklus von Legionellen ist durch zwei diskrete Episoden gekennzeichnet, der "replikativen" und der "transmissiven" Phase (186). Die replikative Phase beginnt in der Laborkultur nach dem Beimpfen des Kulturansatzes und ist seitens des Kulturmediums von einem Überschuss an Nährstoffen gekennzeichnet. Seitens der Bakterien manifestiert sie sich durch aktive Zellteilungen sowie die Unbeweglichkeit (nicht-Flagelliertheit) der Legionellen. Die Stäbchenbakterien sind in dieser Phase besonders lang und teilweise filamentös (186). Die sich anschliessende transmissive (infektiöse) Phase wird durch zunehmende Verknappung der Nährstoffe im Kulturmedium eingeleitet. Der Nährstoffmangel induziert bei *Legionella* die Akkumulation des Stress Signalmoleküls ppGpp (Guanosin-3',5'-bispyrophosphat) welches den Eintritt in die transmissive Phase vermittelt. Diese ist durch die Expression von Transmissionsfaktoren wie z.B. Flagellen und Pili gekennzeichnet (siehe 2.3.4). Die transmissiven Bakterien sind stäbchenförmig, sehr beweglich, zytotoxisch, invasiv und resistent gegenüber Stressfaktoren wie saurem pH und osmotischem Schock (12,32,44,95).

Einleitung

Die intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* kann ebenso in zwei Phasen unterteilt werden. Replikative Bakterien werden in frühen Stadien der Wirtszellinfektion beobachtet, transmissive Zellen kommen in den späten Stadien der Infektion vor, z.B. kurz vor dem Verlassen der Wirtszelle. Die hohe Invasivität der transmissiven Bakterien erleichtert dann die Reinfektion von Wirtszellen im nächsten Infektionszyklus (44).

Phagozytierte Bakterien die keine speziellen Abwehr- bzw. Überlebensstrategien entwickelt haben, werden normalerweise sowohl von Protozoen als auch tierischen Immunzellen lysiert. Spezialisierte Zellkompartimente, die Lysosomen, enthalten ein stark saures Milieu sowie eine Reihe spezialisierter Verdauungsenzyme, die nach der phagolysosomalen Verschmelzung die eingeschlossenen Bakterien zersetzen. Damit werden zum einen Nährstoffe erschlossen und zum anderen Eindringlinge unschädlich gemacht. Das Schlüsselcharakteristikum von *L. pneumophila* ist die Fähigkeit, sich der phagolysosomalen Zersetzung zu entziehen und intrazellulär zu parasitieren und zu replizieren. Als Wirte wurden in der Umwelt Protozoen, vor allem Amöben beschrieben, im Menschen Alveolarmakrophagen und Lungenepithelzellen (67,111,185). Der phagolysosomale Degradationsweg ist innerhalb der Eukaryonten stark konserviert, und so überrascht es nicht, dass auch die bakteriellen Strategien zu dessen Vermeidung sowohl in Amöben als auch in Immunzellen starke Ähnlichkeiten aufzeigen (81).

Die Schlüsselstrategie von *L. pneumophila* zur Besiedlung von Wirtszellen ist die Inhibition der Verschmelzung von Phagosom und Lysosom (Abb. 2.1). Mutanten, denen diese Fähigkeit fehlt, sind zur Vermehrung innerhalb der Wirtszellen unfähig und daher auch nicht in der Lage die Legionärserkrankung zu verursachen (108,109).

Die Aufnahme von *L. pneumophila* in humane Wirtszellen kann sowohl über einen Aktin-abhängigen wirtszellinduzierten Weg verlaufen, der bei Präsenz opsonierter Bakterien von den Komplementrezeptoren CR1 und CR3 vermittelt wird, als auch über einen aktiv-invasiven Weg durch die Bakterien. Dieser verläuft unabhängig vom Komplementsystem über bakterielle Adhäsine (85,109,181). Bereits während der Aufnahme der Bakterien beginnen diese, den endolysosomalen Degradationsweg der Wirtszelle durch die Injektion zahlreicher Effektormoleküle durch das TypIVB Dot/Icm (siehe 2.2.3.2) Proteinsekretionssystem zu unterbrechen.

Einleitung

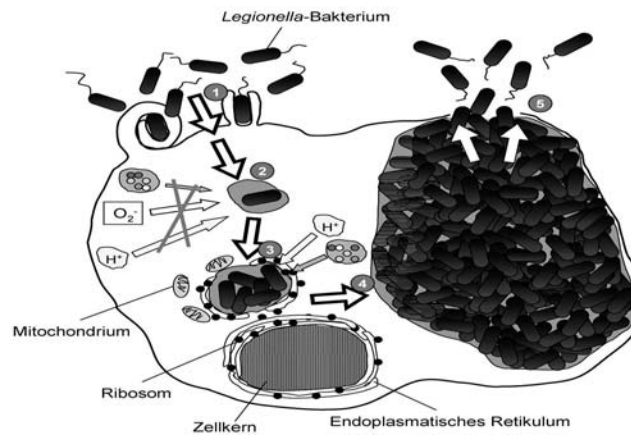


Abb.2.1 Infektionszyklus von *L. pneumophila* im Makrophagen.

1) Aufnahme der Bakterien via *coiling*- oder konventioneller Phagozytose. 2) Inhibition der phagolysosomalen Verschmelzung: Vermeidung von *oxidative burst* und Ansäuerung des Legionellen-Phagosoms 3) Akquisition von Mitochondrien und endoplasmatischem Retikulum an das Legionellen-Phagosom, Beginn der intraphagosomalen Vermehrung von *Legionella*. In einigen Zelltypen wird die phagolysosomale Verschmelzung und die Ansäuerung des Phagolysosoms erst nach dem Einsetzen der bakteriellen Vermehrung beobachtet. 4) Die sich vermehrenden Bakterien füllen das Phagosom aus. 5) Nach Verbrauch der lokalen Nährstoffreserven findet die Expression von bakteriellen Transmissionsfaktoren (Flagellen, Adhäsine, Toxine) statt und die Bakterien treten in ihre virulente (zytotoxische, transmissive) Form über. Durch Lyse der phagosomalen Membran und der Wirtszellmembran gelangen die Bakterien in den extrazellulären Raum und können einen neuen Infektionszyklus initiieren. (Flieger, Bundesgesundheitsblatt 2006)

Die Blockierung dieser wirtszelleigenen Abwehrmassnahme erlaubt es den Legionellen, sich innerhalb des Phagosoms, in das sie nach der Aufnahme eingeschlossen werden, zu etablieren. Die Ansäuerung des Kompartiments als auch die Ausschüttung von Verdauungsenzymen aus den Lysosomen unterbleibt zunächst (107,110). Jedoch beginnt das Phagosom bereits eine Stunde nach Infektionsbeginn mit sekretorischen Vesikeln aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) und mit Mitochondrien zu assoziieren. Fünf Stunden nach Infektionsbeginn ist das Phagosom vollständig von mehreren Schichten rauer ER Membran umgeben und die Bakterien beginnen sich zu replizieren (1,64,111). Erst 18 Stunden nach Infektionsbeginn wurden phagolysosomale Marker wie Cathepsin D und eine Ansäuerung des Legionellen enthaltenen Phagosoms in infizierten Knochenmarksmakrophagen von A/J Mäusen nachgewiesen. Offensichtlich findet die phagolysosomale Fusion zu einem wesentlich späteren Zeitpunkt (und auch nur in einigen Zelltypen) statt, wenn die Erreger bereits Säureresistenz entwickelt haben (219). Etwa 24 Stunden nach Infektionsbeginn hat sich die Bakterienanzahl im Legionellenphagosom 50- bis 100-fach erhöht. Mit einer Verknappung der Aminosäurereserven treten die Bakterien in ihre transmissive, virulente Phase ein, was schliesslich zum lytischen, eventuell auch nicht-lytischem, exozytotischen (38), Verlassen der Wirtszelle führt und den Beginn eines neuen Infektionszyklus einleitet (150).

2.3 Virulenzfaktoren von *L. pneumophila*

2.3.1 Proteinsekretionssysteme von *L. pneumophila* und ihre Rolle für die Virulenz

Pathogene Bakterien sind in vielerlei Hinsicht darauf angewiesen Effektorproteine, die die Pathogen-Wirts-Interaktion zu Gunsten des Bakteriums modulieren, in das umgebende Medium oder sogar direkt in die Wirtszelle zu translozieren. In gram-negativen Bakterien, die eine innere und eine äussere Zellmembran sowie einen periplasmatischen Raum besitzen, müssen Effektoren zunächst diese drei Zellschichten passieren, um an ihren Wirkort zu gelangen. Es wurden mehrere spezialisierte Sekretionswege beschrieben. Die Sec oder Tat Transportersysteme vermitteln den Substrat-Transport vom Zytoplasma über die innere Membran in den periplasmatischen Raum. Sec- und Tat-Substrate besitzen ein N-terminal lokalisiertes Signalpeptid, welches während dem Transport durch Signalpeptidasen abgespalten wird. Für die Sekretion in den extrazellulären Raum oder direkt in Wirtszellen wurden bislang 6 Haupttypen von Transportsystemen – Typ I bis Typ VI - beschrieben. Die jeweiligen Substrate tragen in der Regel Sekretionssignale, welche ihre Erkennung durch den vorgesehenen Sekretionsweg ermöglicht (84). Die Kenntnisse über die genaue Natur der Sekretionssignale sind noch lückenhaft und Gegenstand intensiver Forschung.

Zahlreiche Studien haben die essentielle Rolle der Proteinsekretionssysteme für die Legionelleninfektion gezeigt. Neben den Sec und Tat Systemen (52,226) wurde ein putatives Typ I Sekretionssystem Lss identifiziert, für das bislang jedoch noch keine Substrate bekannt sind (115). Die prominenteste virulenzassoziierte Rolle kommt dem Typ IVB Sekretionssystem Dot/Icm und dem Typ II Sekretionssystem Lsp zu. *L. pneumophila* verfügt über insgesamt mindestens 3 verschiedene Typ IV Sekretionssysteme, die sich vom bakteriellen Konjugationssystem ableiten und auch als solche funktionieren. Die Systeme Lvh (205) und das kürzlich in *L. pneumophila* Corby identifizierte Tra System (87) sind nahe verwandt mit dem *Agrobacterium tumefaciens* Vir-, einem Typ IVA Sekretionssystem. Das Typ IVB Dot/Icm System besitzt in *L. pneumophila* jedoch nur zwei homologe Komponenten zum Typ IVA System und ist strukturell und funktionell weitgehend uncharakterisiert. Das Vorhandensein eines putativen Typ V Autotransporters wurde neuerlich auf Basis von DNA Sequenzanalysen postuliert (18). Die beiden aus heutiger Sicht für die Virulenz und Pathogenese von *L. pneumophila* wichtigsten Sekretionssysteme Dot/Icm und Lsp sollen aufgrund der Fülle von verfügbaren Daten und der grossen Zahl charakterisierter Substrate in den folgenden beiden Abschnitten vorgestellt werden.

2.3.2 Das *L. pneumophila* Dot/Icm Sekretionssystem

L. pneumophila Dot (*defect in organelle trafficking*)/ Icm (*intracellular multiplication*) ist ein Typ IVB Proteinsekretionssystem, welches auf zwei chromosomalen Regionen kodiert ist. Region I enthält 7 Gene (*icm V, W* und *dotA, B, C, D*) und Region II trägt 18 *icm* Gene (*T, S, R, Q, P, O, N, M, L, K, E, G, C, D, J, B, F* und *H*) (204,231). Die meisten der *dot/icm* Gene sind essentiell für die intrazelluläre Replikation des Bakteriums in Amöben, Makrophagen oder im Meerschweinchenmodell (61,204). Bereits für die frühen Prozesse der *Legionella*-Wirt Interaktion spielt das Dot/Icm System eine kritische Rolle. Die Stimulation der phagozytotischen Aufnahme in die Wirtszelle, die Unterbrechung des phagolysosomalen Degradationsweges, die Etablierung des Legionellen enthaltenden Phagosoms sowie die Apoptoseinhibition verlaufen Dot/Icm abhängig (30,81,151,204,225,231).

Bis heute sind mindestens 51 Dot/Icm translozierte Substrate identifiziert worden (122,162). Viele dieser Proteine tragen hydrophobe, C-terminal lokalisierte Aminosäuren, die als putatives Translokationssignal diskutiert wurden (122,156). Die Expression eines grossen Teils der Dot/Icm Substrate ist in der frühen stationären Wachstumsphase von *L. pneumophila* transkriptionell hoch reguliert, was als Zeichen für deren mögliche wichtige Rolle in der infektiösen Phase des Bakteriums interpretiert wird. Trotzdem verursacht die Deletion einzelner Dot/Icm Substrate in der Regel keine oder nur geringfügige Effekte auf die intrazelluläre Replikation von *Legionella* in der Wirtszelle. Ursächlich könnte dies auf das Vorhandensein mehrerer Paraloge des betreffenden Dot/Icm Substrats auf dem *Legionella*-Chromosom und die damit verbundene funktionelle Redundanz zurückgeführt werden (162). Wichtige funktionell charakterisierte Substrate sind RalF, LidA und DrrA(SidM), die an der Rekrutierung von ER-Vesikeln an das Phagosom beteiligt sind. RalF arretiert das Wirtszellprotein Arf1 (ADP Ribosylierungs- Faktor) in einem aktivierten Zustand, was die Rekrutierung von ER begünstigt (156). LidA spielt für die Zellintegrität eine Rolle und ist ebenfalls in die Rekrutierung von ER involviert (48). DrrA ist ein Guanidinnukleotid-Austauschfaktor für die Wirtszell- GTPase Rab1, die vesikuläre Transportprozesse reguliert (141,154). Die Typ IVB sekretierten Effektoren LepA und LepB spielen für das vermutlich exozytotische Verlassen von Protozoen durch die Bakterien nach erfolgter intrazellulärer Replikation eine wichtige Rolle (38,48,57). Neuerlich wurde ein weiteres Dot/Icm Substrat (LubX) identifiziert, welches zwei U-Box Domänen besitzt und Clk1 (CDC2-like Kinase 1) der Wirtszelle ubiquitiniliert, was die intrazelluläre Replikation von *Legionella* auf noch ungeklärte Weise fördert (122). Drei weitere Proteine, die als Dot/Icm Substrate identifiziert wurden, sind VipA, VipD und VipF. Alle drei verursachen eine Störung des Vps (*vacuolar protein sorting*) und wurden in einem entsprechenden Screen in *S. cerevisiae* identifiziert (211). VipD ist eine putative Phospholipase A und wird im Abschnitt 2.5.5 näher beschrieben.

2.3.3 Das *L. pneumophila* Lsp Sekretionssystem

L. pneumophila Lsp (*Legionella secretion pathway*) ist ein Typ II Proteinsekretionssystem, welches von 11 Genen kodiert wird, die auf fünf Regionen des bakteriellen Chromosoms lokalisiert sind. Die Typ II Sekretion verläuft mechanistisch in zwei Schritten. Der Substrattransport durch die innere Membran erfolgt, je nach Signalpeptid, über das Sec oder Tat System. Vom Periplasma aus gelangt die Fracht anschliessend in den Typ II Sekretionsapparat, welcher aus einem in der inneren Membran lokalisierten Multiproteinkomplex (LspC,L,M,F,G,H,I,J,K), der ATPase LspE und einem in der äusseren Membran verankerten Ringkomplex (Sekretin, LspD) aufgebaut ist (182,188,193).

Typ II Sekretionssysteme wurden bisher nur in wenigen intrazellulären Pathogenen identifiziert, neben *L. pneumophila* und *Yersinia* sp. (nicht primär intrazellulär) neuerlich durch Genomsequenzanalysen auch in *Francisella tularensis* (42,74). Das *Legionella* Lsp System ist das erste, welches direkt mit intrazellulärer Virulenz in Verbindung gebracht wurde. *Legionella* Lsp Mutanten zeigen attenuierte Replikation in Amöben, Makrophagen und im Tiermodell (93,135,182,184) sowie eine reduzierte Fähigkeit zur Kolonisierung bzw. Etablierung von Biofilmen (137).

Obwohl eine Reihe von Lsp Substraten identifiziert und charakterisiert worden sind, so wurde doch für die Mehrheit keine signifikante Rolle für die intrazelluläre Replikation in Wirtszellen gefunden. Die einzige Ausnahme bildet die Zink-abhängige Metalloprotease ProA/Msp (93,149), die für die intrazelluläre Replikation von *Legionella pneumophila* in *Hartmanella vermiformis* essentiell, für die Replikation in *A. castellanii* und humanen U937 Makrophagen jedoch vernachlässigbar ist (183). Weitere charakterisierte Typ II Sekretionssubstrate sind RNase, saure Phosphatasen, die Lipasen LipA und LipB, die Phospholipase C PlcA, die Lysophospholipase A PlaA, die Phospholipase A / Azytransferase PlaC und die kürzlich identifizierten Aminopeptidasen LapA und LapB (7-9,15,16,72,182-184). PlaA und PlaC werden im Abschnitt 2.4.2 genauer beschrieben. Es existieren zahlreiche weitere Proteine, die aufgrund ihrer Signalpeptide mögliche Kandidaten für Lsp Sekretion sind. Darunter sind mehrere sogenannte hypothetische Proteine und eine Chitinase, welche eine kritische Rolle für die intrazelluläre Replikation im Mausmodell besitzt (54).

Phospholipasen sind auf verschiedenen Ebenen in der Lage, die zelluläre Integrität von Zielzellen oder deren Signalkaskaden zu beeinflussen. Diese Enzyme werden im folgenden Kapitel 2.4 vorgestellt. Insbesondere wird ihre putative Rolle in der Pathogenese erläutert.

2.4 Eigenschaften von Phospholipasen A

Phospholipide sind die hauptsächliche strukturelle Komponente von Biomembranen eukaryontischer und prokaryontischer Zellen. Sie sind daher zentral an sämtlichen

Einleitung

Lebensvorgängen zellulärer Organismen beteiligt. Das beinhaltet sowohl strukturelle Eigenschaften (Kompartimentierung) zellulärer Organismen als auch funktionelle Eigenschaften wie den Energiestoffwechsel (Ionengradienten, Fettsäureoxidation), Regulation (Fettsäure *second messenger*), intrazellulärer Transport und Proteinreifung (Endomembransystem).

Phospholipasen spalten Phospholipide und sind deshalb wesentlich an der Organisation und Modellierung zellulärer Funktionen und Eigenschaften beteiligt. Pathogene Organismen aller biologischen Reiche (Bakterien, Pilze, Eukaryonten sowie Viren) machen von der Universalität der Phospholipasen als molekulare Werkzeuge zur Modellierung von Wirtszellfunktionen Gebrauch und generieren Virulenzfaktoren, die Phospholipaseaktivität besitzen (34,86,88,177,196).

Glyzerophospholipide bestehen aus einem Glyzerol-Rückgrat, an das in sn1 und sn2 Position langkettige Fettsäurereste über Esterbindungen gekoppelt sind. An die sn3 Position des Glyzerols ist die alkoholische Kopfgruppe (z.B. Cholin) über einen Phosphodiester gebunden. Phospholipasen spalten die Esterbindungen in Phospholipiden (Abb. 2.2) und können in Azyldhydrolasen und Phosphodiesterasen unterteilt werden.

Azyldhydrolasen [Phospholipasen A (PLA) und Lysophospholipasen (LPLA)] spalten die Esterbindungen an der sn1 oder der sn2 Position des Phospholipids und setzen Fettsäuren und wasserlösliche Glyzerophosphodiester frei. Das Phospholipid Dipalmitoylphosphatidylcholin (DPPC) zum Beispiel wird von Azyldhydrolasen in zwei Moleküle Palmitinsäure und ein Molekül Glyzerophosphorylcholin gespalten. Dieser Prozess verläuft in zwei Schritten: DPPC wird durch PLA in Palmitinsäure und Monopalmitoyllysophosphatidylcholin (MPLPC) gespalten. Im zweiten Schritt wird MPLPC durch LPLA in wiederum ein Molekül Palmitinsäure und Glyzerophosphorylcholin gespalten (Abb. 2.2). LPLA bilden eine Untergruppe der PLA, die präferenziell die Fettsäurekette von Monoazyldphospholipiden, also Lysophospholipiden (die durch PLA Hydrolyse von Diazyldphospholipiden generiert werden), spalten. Die Reaktionsprodukte stehen dann zum Beispiel dem Energiestoffwechsel zur Verfügung: Freie Fettsäuren (Palmitinsäure) können über die β -Oxidation dem Zitratzyklus zugeführt werden und in Reduktionsäquivalente umgesetzt werden. Glyzerophosphorylcholin kann zu Glyzerol-3-Phosphat hydrolysiert werden, was wiederum zum Beispiel zu Triazyldglyzerol umgebaut werden kann.

Phosphodiesterasen wie Phospholipasen C und D sind in der Lage die alkoholische Kopfgruppe von Phospholipiden abzuspalten und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit.

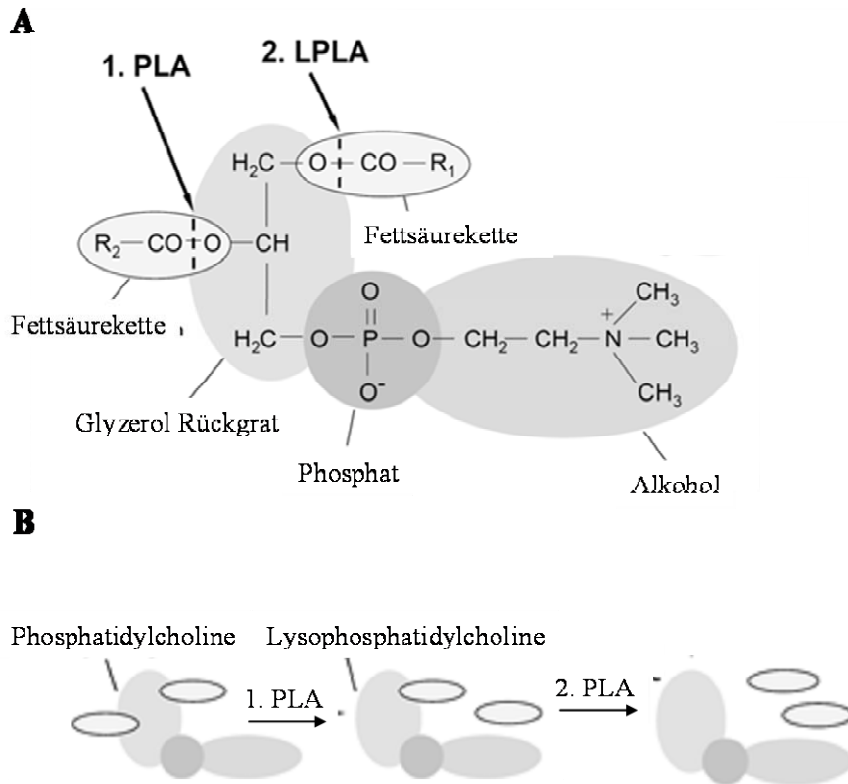


Abb. 2.2 Strukturelle Eigenschaften eines Phospholipids (Phosphatidylcholin) (A) und dessen Hydrolyse in zwei Schritten durch Phospholipase A (PLA) und Lysophospholipase A (LPLA) Aktivität (B) (15).

2.4.1 Phospholipasen als bakterielle Pathogenitätsfaktoren

Phospholipasen tragen zur Virulenz vieler pathogener Bakterien bei. Die Wirkstrategien der Phospholipasen sind dabei vielgestaltig, doch insgesamt lassen sich zwei grundsätzliche Mechanismen ableiten: Die Wirkung der Phospholipasen zielt zum einen auf Zerstörung der Integrität von Membranen und ist damit zytotoxisch, zum anderen zielt sie auf wirtszelleigene Signalkaskaden und deren Manipulation (114,196,201,213,215,229).

Zwei *L. monocytogenes* Phospholipasen C (PlcA und PlcB) sind zum Beispiel essentiell an der Zerstörung der phagosomalen Membran beteiligt und ermöglichen somit die Translokation der Bakterien vom Phagosom ins Wirtszellzytosol bzw. zur nächsten Wirtszelle (214). Für die Virulenz von bakteriellen Lungenpathogenen ist von besonderer Bedeutung, dass die Lipide des Lungensurfactants, einer monomolekularen Phospholipidschicht, die die Alveolen auskleidet, potentielle Substrate für deren Phospholipasen darstellen (70,133). Ihre Zerstörung trägt massgeblich zum Lungenfunktionsverlust bei einer Pneumonie bei (106).

Die Reaktionsprodukte der Phospholipidhydrolyse [1,2-Diacylglycerol, Fettsäuren (vor allem Arachidonsäure) und Lysophospholipide] können direkt oder indirekt als Botenstoffe (*second messenger*) in wirtszelleigene Signalkaskaden eingreifen und so zum Beispiel Entzündungsreaktionen oder den programmierten Zelltod manipulieren (55,124,142,172).

Einleitung

Abb. 2.3 gibt eine Übersicht über Wirkstrategien von Phospholipasen als Virulenzfaktoren.

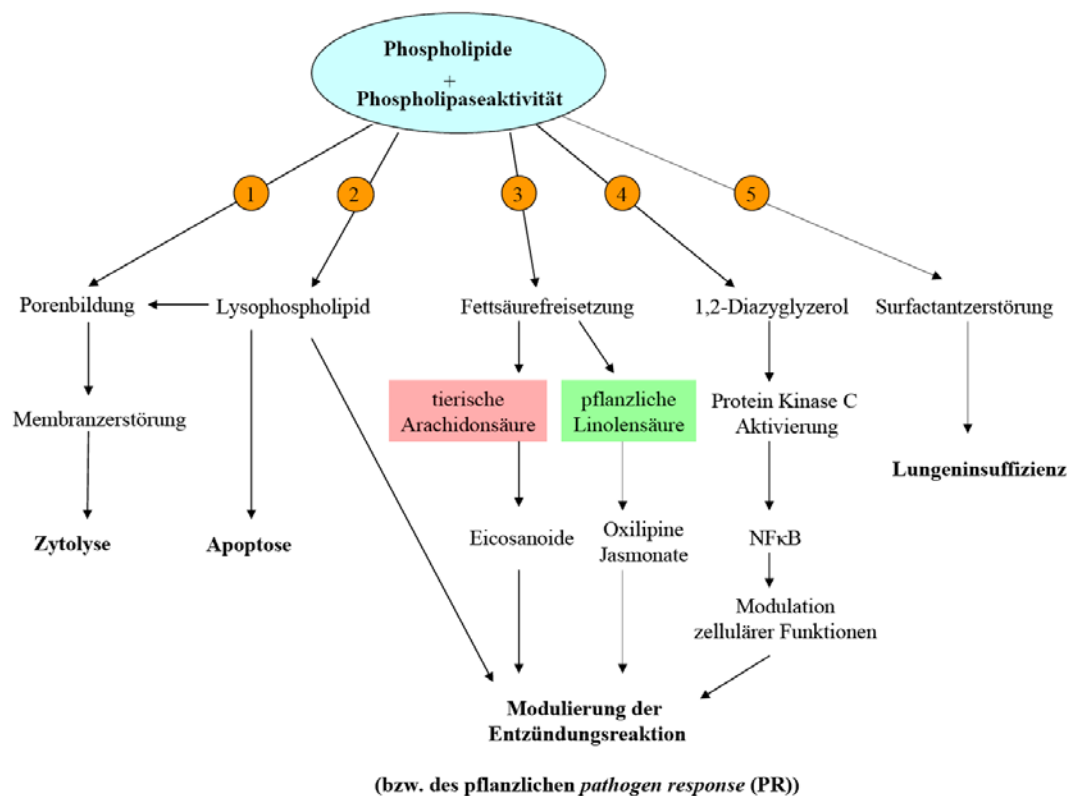


Abb. 2.3 Wirkstrategien bakterieller Phospholipasen in der Pathogenese:

(1) Hydrolyse von Phospholipiden der Zellmembran, Porenbildung (ermöglicht Verlassen des Phagosoms oder der Wirtszelle, verursacht Zytotoxizität); (2) Erzeugung von Lysophospholipid-*second messengern* (Apoptoseinduktion, Auslösen der Entzündungsreaktion, Chemoattraktion z.B. für neutrophile Zellen); (3) Erzeugung von Fettsäure-*second messengern* (Umwandlung in lipophile Hormone); (4) Erzeugung des *second messengers* 1,2-Diacylglycerol (Proteinkinase C Aktivierung, Modulation zellulärer Funktion, Aktivierung proinflammatorischer Gene); (5) Zerstörung von Phospholipiden des Lungensurfactants (Lungenfunktionsstörung).

L. pneumophila exprimiert mehrere phospholipolytische Enzyme, die Phospholipase A/Lysophospholipase A-Aktivität besitzen und im folgenden Abschnitt vorgestellt werden.

2.4.2 Phospholipasen A von *L. pneumophila*

L. pneumophila besitzt sowohl Phospholipase A- als auch Lysophospholipase A-Aktivität. *L. pneumophila* kodiert mindestens 4 dieser Enzyme, die teilweise überlappende Substratspezifitäten besitzen. Zwei dieser Phospholipasen, (PlaA und PlaC) haben Sec-Signalpeptide und werden vom TypII Sekretionssystem Lsp sekretiert. PlaA ist die wichtigste sekretierte *L. pneumophila* LPLA und wird für die Detoxifizierung von toxischen Lysophospholipiden vom Bakterium benötigt (72). PlaC besitzt zusätzlich zur PLA/LPLA Aktivität Azytransferaseaktivität. PlaC kann daher nicht nur Fettsäuren von Phospholipiden und Lysophospholipiden abspalten, sondern diese auch an Cholesterol binden, was ein Hauptbestandteil eukaryontischer (aber nicht prokaryontischer) Membranen ist (16). PlaD ist

Einleitung

zu PlaA und PlaC homolog und ist derzeit Gegenstand von Untersuchungen (Rastew und Flieger, unveröffentlicht) (16). Alle drei genannten Proteine gehören zur Familie der GDSL Serinhydrolasen (Pfam: PF00657), deren Vertreter sich typischerweise durch PLA, LPLA, Azyltransferase, Lipase und hämolytische Aktivität auszeichnen (227).

Neben den GDSL Hydrolasen PlaA, PlaC, PlaD trägt auch PlaB zur *L. pneumophila* PLA/LPLA und zur hämolytischen Aktivität bei (73). PlaB ist jedoch vermutlich an der bakteriellen Oberfläche lokalisiert, wird also nicht in das Kulturmedium abgegeben.

Knockout-Mutanten in jedem der vier Einzelgene PlaA bis PlaD sind in ihrer intrazellulären Replikation in Amöben oder Makrophagen nicht attenuiert, was möglicherweise auf gegenseitige Komplementation der Proteine mit teilweise überlappenden Substratspezifitäten zurückgeführt werden kann (15).

Der biphasische Lebenszyklus von *L. pneumophila* erfordert komplexe regulatorische Netzwerke, die garantieren, dass erforderliche Gene zu einem bestimmten Zeitpunkt transkribiert und translatiert werden. Bei *Legionella* spielen bei der Regulation der transmissiven bzw. der replikativen Lebensphase der alternative Sigmafaktor RpoS (intrazelluläre Infektion, Replikation, Expression von Virulenzfaktoren) und die Zwei-Komponentensysteme LetA/S und PmrA/B (intrazelluläre Replikation, Expression einiger Komponenten des Dot/Icm Systems, Motilität, Zytotoxizität) zentrale Rollen (2,12,78,93,96,130,140). Das gleiche gilt für die Regulation der Phospholipase A-Aktivitäten, die transkriptionell von RpoS und LetA/S kontrolliert werden, aber auch der posttranslationalen Regulation durch proteolytische Aktivierung unterworfen sind.

Die sekretierte PLA/Azyltransferaseaktivität PlaC und die zellassoziierte PLA/LPLA PlaB des Bakteriums werden positiv von RpoS und LetA/S reguliert. Interessanterweise wird die sekretierte LPLA PlaA negativ von den Regulatoren kontrolliert (28). Die posttranslationale Kontrolle der Phospholipasen erfolgt unter Beteiligung der sekretierten *L. pneumophila* Zink-Metalloprotease ProA. *L. pneumophila* ProA Deletionsmutanten besitzen stark reduzierte sekretierte PLA und Azyltransferaseaktivität (16,72).

Zusätzlich zu den vier genannten *L. pneumophila* Phospholipasen A (PlaA, PlaB, PlaC und PlaD) wurde kürzlich die neue Familie der Patatin-ähnlichen Proteine, die im *L. pneumophila* Philadelphia-1 Genom mit 11 Vertretern präsent ist und putative Phospholipasen A darstellt, beschrieben (15).

2.5 Patatin und Patatin-ähnliche Phospholipasen

Die vollständige Sequenzierung von derzeit 4 *L. pneumophila* Stämmen, Philadelphia-1, Paris, Lens und Corby ermöglichte es, die Genome nach bisher unentdeckten konservierten Phospholipasen A zu durchsuchen. Dabei wurde neben Vertretern der bekannten "GDSL" Familie lipolytischer Enzyme (PlaA, PlaC, PlaD) eine weitere Gruppe identifiziert, die Homologie zu eukaryontischen Phospholipasen A besitzt. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zum Kartoffelprotein "Patatin" wurden diese Gene *patatin-like protein* (Patatin-ähnliche Proteine, PLP) Gene genannt. Patatin wurde ursprünglich als Speicherprotein der Kartoffelknolle charakterisiert, besitzt aber nach Transfer aus der Vakuole ins Zytoplasma und dortiger Aktivierung durch die pH Änderung zusätzlich gegenüber einem weiten Substratspektrum Azyldrolase-, Esterase- und Galaktolipase-Aktivität (5,104). Bei umfassenden Datenbankrecherchen stellte sich bald heraus, dass innerhalb der Bakterien mit grosser Häufigkeit PLP kodiert sind, die putative bakterielle Phospholipasen A darstellen. Interessanterweise korreliert das Vorhandensein von PLP Genen auf Bakterienchromosomen mit der Lebensweise des betreffenden Bakteriums. Solche, deren Lebenszyklus von einer engen Interaktion mit Eukaryonten geprägt ist, also insbesondere pathogene oder symbiontische Bakterien, tragen häufig eine grosse Zahl (z.B. *Bradyrhizobium japonicum* n=8, *Mycobacterium tuberculosis* n=8, *Legionella pneumophila* n=11) dieser Gene auf ihren Chromosomen (15,17).

2.5.1 Charakteristika von Patatin und eukaryontischen Patatin-ähnlichen Proteinen

Racusen und Foote publizierten 1980, dass ein 45 kDa Glykoprotein etwa 20% des Gesamtgehaltes an löslichem Protein der Kartoffelknolle bereitstellt und schlugen eine Benennung mit "Patatin" - basierend auf dem spanischen Wort "Patata" für Kartoffel - vor (176). Spätere Studien zeigten dann, dass Patatin auch enzymatische Aktivität als Azyldrolase, Esterase und β -1,3-Glucanase gegenüber einem breiten Substratspektrum besitzt (5,79,104,176,207). Zahlreiche Studien untersuchten die bivalente Rolle des Patatins in der Kartoffel. Neben der Energiespeicherfunktion ist das Protein in Verteidigungsstrategien (*pathogen response*, PR) und Signaltransduktion von Kartoffel- und auch anderen Pflanzen eingebunden (105,199,200,210). β -1,3-Glucanasen stellen typische pflanzliche PR Proteine dar, die an der Zersetzung von β -1,3-Glucan in den Zellwänden phytopathogener Pilze beteiligt sind (210) and Lucas; van Loon und van Strien '99). Strickland *et al.* zeigten experimentell, dass Patatin effektiv die Larvalentwicklung des Kornwurzelwurms *Diabrotica spp.* inhibiert (218). Weitere Evidenz für die Rolle in der pflanzlichen PR lieferte eine Studie mit TMV- (Tabak Mosaik Virus) infizierten Tabakpflanzen (58). Die Expression dreier PLP Gene war in infizierten Blättern stark induziert, was zur Akkumulation von Fettsäure-*second*

Einleitung

messengern (z.B. Jasmonsäure) führte, die PLA-abhängig gebildet werden und Stresssignale vermitteln (Abb. 2.3). Interessanterweise erschwerte jedoch das Ausschalten einer pathogeninduzierten PLP in *Arabidopsis* die Kolonisierung der Pflanze durch den Schlauchpilz *Botrytis cinerea* und *Pseudomonas syringae* pv. tomato. Umgekehrt führte die Überexpression der PLP zur verstärkten Kolonisierung der Pflanze (127). Vermutlich sind diese Pathogene wiederum in der Lage, während der Invasion den pflanzlichen Verteidigungsmechanismus zu untergraben und diesen für ihre Zwecke zu nutzen (z.B. Gewinnung von Lipidabbauprodukten zu Ernährungszwecken). Zwei weitere neuere Studien deuten auf die wichtige Rolle von PLPs in der Pathogenese hin. Mordue *et al.* isolierten in einem Screen von 6000 Insertionsmutanten des Protozoons *Toxoplasma gondii* eine PLP Mutante, die unfähig war, in aktivierten Makrophagen zu überleben und zu replizieren (153). Durch Vergleiche von mRNA-Expressionsprofilen virulenter und nicht-virulenter *Entamoeba histolytica* Kulturen fanden Balderas-Renteria *et al.* insgesamt 8 Gene, die mit der Virulenz der Amöbe korrelieren, darunter ein PLP Gen (14).

Patatin-ähnliche Proteine zeichnen sich strukturell durch eine konservierte katalytische Diade sowie zwei weitere konservierte Regionen aus. Dies wurde zunächst von Hirschberg *et al.* auf Basis von Proteinsequenzvergleichen des Kartoffel-Patatin B2 und der humanen zytosolischen Phospholipase A₂ (cPLA₂) postuliert (Abb. 2.4). Beide Proteine tragen anstelle der unter lipolytischen Enzymen weit verbreiteten katalytischen Triade aus Ser-His-Asp eine putative katalytische Ser-Asp Diade (104,202). Die Hypothese von Hirschberg *et al.* wurde später durch Mutagenesestudien sowie die Kristallstruktur des Patatin Isoenzym Pat17 verifiziert und eine Ser-Asp Diade als für die Katalyse essentiell identifiziert (189).

Einleitung

		Oxianionenloch		
Block I	5	M V T V L S I D G [*] G G I K G I I P A I I L E F L E G	patB2	
	188	P V V A I L G S G G G F R A M V G F S G V M K A L Y	cPLA2	
		Katalytisch aktives Serin		
Block II	46	Y F D V I G G T [*] S T G G L L T	patB2	
	220	C A T Y V A G L S G S T W Y M	cPLA2	
		Katalytisch aktives Aspartat		
Block IV	184	A R Y E F N L V [*] D G A V A T V G D P A L	patB2	
	541	K S K K I H V V D S G L - T F N L P Y P	cPLA2	
		Konserviertes Serin		
Weitere konservierte Region	230	M L L L [*] S L G T G T N	patB2	
	569	D L I I S F D F S A R	cPLA2	

Abb. 2.4 Alignment der konservierten Aminosäuren von PatatinB2 und cPLA₂ inclusive flankierender Sequenzbereiche. Aktive Reste der cPLA₂: Ser228, Asp549 und Oxanionen-Ligand Arg200 sowie entsprechende Reste in PatB2 sind fett gedruckt. Das strukturell wichtige Ser234 in PatB2 ist mit Ser573 von cPLA₂ *aligned* und ist in eukaryontischen Patatinen konserviert (17) (modifiziert nach (104)).

2.5.2 Bakterielle Patatin-ähnliche Proteine und deren Charakteristika

Multiple Alignments von bakteriellen und eukaryontischen PLP-Genen zeigten, dass sich alle Vertreter durch vier homologe, konservierte Blöcke (Blöcke I bis IV) auszeichnen, in denen nur geringe Sequenzunterschiede bestehen (17,169,197). Block I ist eine glycinreiche Region mit einem konservierten Arginin- oder Lysinrest. Beim Patatin Isoenzym Pat17 aus der Kartoffel wurde für Block I eine die Katalyse stabilisierende Rolle als Oxanionloch postuliert (189). Block II folgt dem Block I in einem Abstand von 10 bis 20 Aminosäuren (As) und trägt das katalytisch aktive Serin im Motiv G-X-S-X-G (202). In Block III befindet sich ein konservierter Serinrest, der wegen seiner Fähigkeit zur Wasserstoffbrückenbildung vermutlich ein wichtiges strukturelles Element als Phosphorylierungsstelle darstellt. Der angrenzende konservierte Prolinrest (in Block III und auch IV) ist vermutlich für die richtige Faltung des Proteins wichtig (189). Neben den zahlreichen strukturellen Ähnlichkeiten zwischen bakteriellen und eukaryontischen PLP zeigt die Sequenz des Blocks III Unterschiede. Bakterielle PLP zeigen in Block III die konservierte Sequenz A-S-X-X-X-P, wobei eukaryontische Vertreter die Sequenz A-A-P aufweisen (17). Block IV enthält den katalytisch aktiven Aspartatrest, welcher den zweiten Bestandteil der Diade bildet (189). Zusätzlich zu den beschriebenen 4 Regionen wurde für das Kartoffel-Patatin B2 sowie die

humane cPLA2 eine weitere kurze homologe Region definiert, welche einen konservierten Serinrest enthält (104). Diese Region existiert in mindestens 15 weiteren eukaryontischen PLPs, jedoch in keinem der bakteriellen Proteine (Abb.2.4) (17). Insgesamt teilen pro- und eukaryontische PLP viele, aber nicht alle strukturelle Eigenschaften. Dies lässt auf einen gemeinsamen, jedoch evolutionär weit zurückliegenden Ursprung schliessen.

Aufgrund der innerhalb der Bakterien sehr charakteristischen und im Vergleich zu anderen bakteriellen lipolytischen Enzymen diskreten Eigenschaften von PLP wurde diese Proteingruppe von Banerji und Flieger (2004), basierend auf *in silico* Analysen von 123 vollständig sequenzierten bakteriellen Genomen, als neue und weit verbreitete Familie bakterieller lipolytischer Enzyme beschrieben (17). PLP Gene sind sowohl in gram negativen (*Brucella sp.*, *Rickettsia sp.*, *Yersinia pestis*) als auch gram positiven Spezies (*Bacillus sp.*, *Staphylococcus aureus*) vorhanden und treten in einigen Genomen sehr gehäuft auf: *Bradyrhizobium japonicum* (n=8), *Leptospira interrogans* (n=6), *Mycobacterium tuberculosis* (n=8), *Legionella pneumophila* Philadelphia (n=11).

Die erste Erwähnung in experimentellen Arbeiten findet das Vorhandensein eines bakteriellen Patatin-Homologs im Jahr 2003 im Zusammenhang mit *P. aeruginosa* ExoU. Das Zytotoxin ExoU trägt eine Patatindomäne, die für dessen Phospholipase A-Aktivität und Toxizität essentiell ist (169,197). Neben den inzwischen zahlreichen und umfassenden Berichten über *P. aeruginosa* ExoU existieren lediglich zwei weitere bakterielle PLP, die experimentell untersucht wurden. Das *Myxococcus xanthus* PLP Protein MXAN_3852 wurde initial biochemisch charakterisiert und zeigte enzymatische Aktivität gegenüber p-Nitrophenylester-Substraten (152). Das *L. pneumophila* PLP VipD wurde in einem Screen nach *Legionella*-Effektoren, die mit dem Vesikeltransport in Hefe interferieren, als Typ IVB sekretierter Effektor identifiziert (211,228) (siehe 2.5.5). Weiterführende Daten, etwa zu anderen PLP in bakteriellen- und insbesondere im *L. pneumophila* Genom, sind ebenso wie Erkenntnisse über ihre biologische Signifikanz für Bakterien bis heute in der Literatur rar.

Im Jahre 2004 wurde von Banerji & Flieger erstmalig darauf hingewiesen, dass bakterielle PLP ausgesprochen zahlreich und weit verbreitet vorkommen (17). Zugleich wurde in dieser Studie gezeigt, dass dies insbesondere für die Genome symbiontischer oder pathogener Mikroorganismen zutrifft und postuliert, dass diese Gene wichtige Effektoren für die Pathogen-Wirt-Interaktion kodieren könnten. Die Erforschung dieser neuen Familie bakterieller lipolytischer Enzyme steckt noch in den Kinderschuhen. Ziel dieser Arbeit wird es daher sein, mehr über die lipolytische Aktivität der *L. pneumophila* PLP und ihre Rolle als putative Virulenzfaktoren zu erfahren.

2.5.3 Virulenzbezug bakterieller Patatin-ähnlicher Proteine, *P. aeruginosa* ExoU

Neben *L. pneumophila* VipD/PatA, für das eine virulenzassoziierte Rolle in der Manipulation des Wirtszell-Vesikeltransportes beschrieben wurde (siehe 2.5.5) ist *P. aeruginosa* ExoU das einzige umfassend charakterisierte bakterielle PLP. ExoU besitzt eine direkte Implikation für die Virulenz von *Pseudomonas aeruginosa* und trägt massgeblich zur Etablierung und Generalisierung der akuten *P. aeruginosa* Infektion bei. ExoU-exprimierende *P. aeruginosa*-Stämme verursachen schwerere klinische Verläufe mit häufig schlechterem Ausgang im Vergleich zu Stämmen, die ExoU nicht exprimieren (20,98). Weiterhin ist ExoU für eine Reihe von humanen Zellen sowie für Hefe zytotoxisch (3,20,68,99,196) und induziert septischen Schock in Kaninchen (125). Im Mausinfektionsmodell korrelieren die Zerstörung von Epithelzellen, die bakterielle Persistenz, die Etablierung der Lungenentzündung und die Induktion von septischem Schock mit der ExoU Expression (99,166,209).

ExoU hat ein Molekulargewicht von 74k Da und besitzt nach Aktivierung durch den eukaryontischen Kofaktor Superoxidismutase (SOD) (194) vor allem Lysophosphatidylcholin (LPC)-spezifische LPLA Aktivität und Phosphatidylcholin (PC)-spezifische PLA Aktivität *in vitro* (195,221) und *in vivo* (169). Das Protein wird vom *P. aeruginosa* Typ III-Sekretionssystem direkt in Wirtszellen injiziert und lokalisiert daraufhin an die Zytoplasmamembran. Sowohl für die membranständige intrazelluläre Lokalisation als auch für die PLA Aktivität *in vivo* sind 5 C-terminal lokalisierte Aminosäuren notwendig (175,216).

Zusätzlich zur zytotoxischen Aktivität verursacht *P. aeruginosa* ExoU systemische immunomodulatorische Effekte, wie in einer Studie von Saliba *et al.* gezeigt wurde. Durch Freisetzung von Arachidonsäure (AA) aus der eukaryontischen Zellmembran und Aktivierung der Arachidonsäurekaskade wird die Entzündungsreaktion ExoU-abhängig moduliert (191). Diese proinflammatorische Aktivität konnte auf die PLA Aktivität von ExoU zurückgeführt werden und war durch Applikation von Zyclooxygenase (COX) und Lipoxxygenase-Inhibitoren im Mausmodell signifikant verringerbar (191).

Zusätzlich greift ExoU auf transkriptioneller Ebene in die Regulation der Entzündungsreaktion ein. ExoU aktiviert mehrere Transkriptionsfaktoren, die Zellteilung und Zytokinproduktion regulieren. Die Expression des Transkriptionsfaktor c-Fos wird ExoU abhängig stark induziert und daraufhin in den Zellkern translokalisiert (147). Cuzick *et al.* (2006) zeigten neuerlich, dass ein zweiter Transkriptionsfaktor (c-Jun) ExoU abhängig aktiviert wird, was eine Induktion der Interleukin-8 (IL-8) Freisetzung zu Folge hat (50). c-Jun und c-Fos translokalisieren beide in den Zellkern und sind dort an der Bildung des AP-1 Komplexes beteiligt, welcher die Expression von Genen kontrolliert, die Zellteilung, Entzündungsreaktion und Zelltod regulieren.

Insgesamt spielt ExoU für die *P. aeruginosa*-Infektion also eine vielgestaltige und zentrale Rolle, die sich durch Zytotoxizität, Generation von *second messengers*, Modulation der Signaltransduktion und Zytokininduktion auszeichnet. Daher bildet ExoU einen wichtigen Vertreter bakterieller PLP, der entscheidend an der Pathogenese eines bakteriellen Erregers beteiligt ist.

2.5.4 Patatin-ähnliche Proteine von *L. pneumophila*

Das Genom von *L. pneumophila* Philadelphia-1 kodiert die hohe Zahl von 11 PLP, die in alphabetischer Reihenfolge mit *patA* bis *patK* benannt wurden. Alle 11 PLP tragen die vier charakteristischen konservierten Aminosäureblöcke bakterieller PLP, was ihre Zugehörigkeit zu dieser neuen bakteriellen Proteinfamilie zeigt (15). Die Patatindomäne der *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP ist vorwiegend N-terminal lokalisiert. Alle *L. pneumophila* PLP haben eine der Patatindomäne nachgelagerte Region, die mindestens 126 Aminosäuren umfasst. Vier *L. pneumophila* PLP besitzen besonders lange C-terminale Extensionen von > 200 Aminosäuren. Basierend auf der Länge der C-Termini wurden die *L. pneumophila* PLP in zwei Gruppen eingeteilt. Gruppe I, mit C-Termini < 200 Aminosäuren wurden PatB, D, E, H, I, J, K zugeordnet. Zur Gruppe II, die verlängerte C-Termini besitzen, gehören dementsprechend PatA, C, F, G. Die biologische Bedeutung der *L. pneumophila* PLP C-Termini ist unklar, einzig die C-terminale Region von PatA/VipD wurde als essentiell für dessen Dot/Icm abhängige Translokation in die Wirtszelle identifiziert (211). Nagai *et al.* (2002) postulierten, dass C-terminal lokalisierte hydrophobe Aminosäuren in -3 oder -4 Position Dot/Icm abhängig sekretierter *L. pneumophila*-Effektoren Translokationssignale bilden (156). Zusätzlich zu PatA/VipD besitzen PatB, F, G, H und J hydrophobe C-Termini und kommen daher der These von Nagai *et al.* folgend als mögliche Dot/Icm Substrate in Frage. Tatsächlich identifizierten VanRheenen *et al.* (2006) zwei weitere *L. pneumophila* PatA/VipD Paraloge, nämlich VpdA (PatC) und VpdB (PatG), die vom Dot/Icm Sekretionssystem in eukaryontische Wirtszellen injiziert werden (228). Einige der *L. pneumophila* PLP, PatA, C, D, F, J und K haben N-terminal zur Patatin Domäne Extensionen von ≥ 20 Aminosäuren. PatF besitzt dabei eine herausragend lange N-terminale Extension von > 300 Aminosäuren (Abb. 2.5, Tab. 2.1).

Einleitung

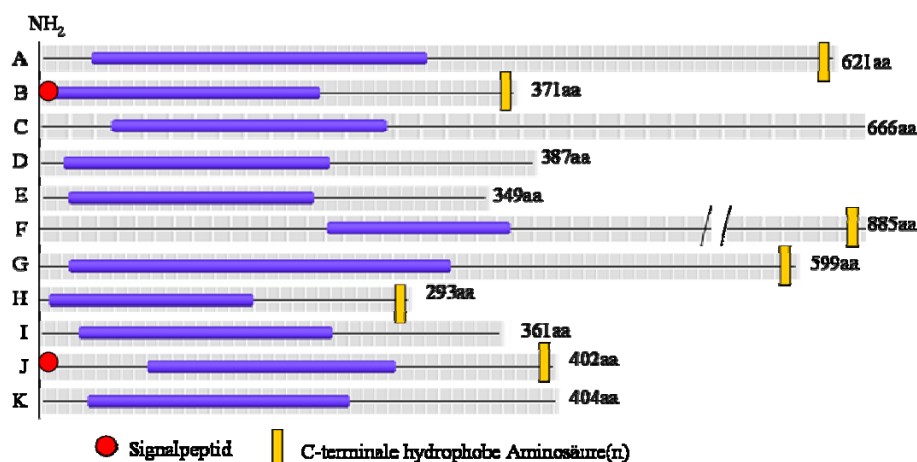


Abb. 2.5 11 Patatin-ähnliche Proteine von *L. pneumophila*.

PatA-PatK tragen eine konservierte Patatindomäne (InterPro IPR002641; blaue Balken). Die Domäne ist bei allen PLP N-terminal oder mittig angeordnet. Zusätzliche signifikante Homologien zu anderen Proteinen existieren bei keinem der PLP. PatB und PatJ tragen jeweils ein 19 As Signalpeptid, PatA, B, F, G, H, J besitzen hydrophobe C-terminale Reste.

Tab. 2.1 Partielles Proteinsequenzalignment der 11 *L. pneumophila* PLP, *P. aeruginosa* ExoU und *Solanum tuberosum* Patatin B2. Aligned wurde nach ClustalW (224) mit der Software Megalign (DNASar). Reste, die in > 8 Proteinen konserviert vorliegen sind fett gedruckt. Die Pfeile kennzeichnen die putativen aktiven Reste der katalytischen Diade.

Name	SP	Δ	Oxianionenloch (Block I)	Δ	Serin Hydrolase Motiv (Block II)
ExoU	-	109	SGGGAKGAAYPGAMLA	14	GSSAGGITAALLASGMSPAA
PatA/VipD	-	40	SGGGAKGISYLGMIQA	14	GAAGAMTASILAVGMDIKD
PatB	+	9	AGGGARGAYQAGVLKA	16	GVSVGSVNAAVLAENANDFP
PatC	-	59	SGGSRILAHIGALDE	12	GSSAGAMVAFAAYLGYNCS
PatD	-	20	QGGGALGAYQAGVLHA	12	GTSIGAINAAIAAGNSDKER
PatE	-	8	QGGGALGAYELGVLYKY	13	GVSIGAINAAALIGAKDEPI
PatF	-	306	CGGGAKIFAHVGVWKA	12	GSSAGAIMSLMCYLYGTADE
PatG	-	9	RGGGSKGIAYVGALQS	14	GSSAGAMTAIIVACGGSADL
PatH	-	12	GSGSARGWAHIGVIQS	12	GCSIGALVGAIYACGTLDLF
PatI	-	12	QGGGAHGALAWGIIDR	13	ATSAGAMNAAVLAYGFATGG
PatJ	+	84	SGGGDYGAAGAGLLNG	14	GISTGALIAPLAFAGPKYDA
PatK	-	37	QGGGSLGAYQFVVVKG	12	ATSIGAIQAIIIVGNPPEKR
Patatin	-	34	DGGGIKGIIPATILEF	24	GTSTGGLLTAMITTPNENNR

Name	Δ	Konserviertes Prolin (Block III)	Δ	Aktives Aspartat (Block IV)	Δ
ExoU	149	VAQAAHISGSFPGVFQK	15	EFQDGGVMINVP	325
PatA/VipD	175	IAQVVQWSGAHPVLFVP	7	YIADGGILDNMP	325
PatB	116	NAQHILASSALPLFFPP	6	HYGDGSI GLVAP	158
PatC	128	LADAIISANLPFAFER	6	VYSDGGISNNLP	395
PatD	118	GPEHIMASGALPPGFPA	6	YYWDGGISSNSP	166
PatE	111	TPHLVLAGSLPPGFPM	6	YYWDGGGLFSNTP	141
PatF	102	VSEAVKISASFVLYRD	6	EHNDGGILSNFP	572
PatG	207	VSIIVRISASLPGVFDP	6	KYIDGGAANNLP	277
PatH	70	LELAIRSSMSLPGLFTP	6	WLVDGGVLVNPVP	126
PatI	108	SADAVMASACLPMFQA	6	YFWDDGGYMGNPA	137
PatJ	94	FRKILLASASIPVVMPP	14	MHVDDGSTTFAVF	130
PatK	115	EVEHIMASALPPGFPA	6	LYWDGGVHSNTP	172
Patatin	85	MYDICYSTAAAPFYFPP	15	NLVDGAVATVGDP	123

2.5.5 Das Patatin-ähnliche Protein PatA/VipD von *L. pneumophila* Philadelphia-1

Legionella VipD (in den Arbeiten der NG5 des Robert Koch-Instituts mit PatA benannt) wurde zeitnah von zwei unabhängigen Arbeitsgruppen und mit verschiedenen experimentellen Ansätzen identifiziert. Shohdy *et al.* (2005) screenen eine *L. pneumophila* Expressionsbank in *Saccharomyces cerevisiae* auf genomische Fragmente, die den Vesikeltransport der Hefe stören (211). Dabei identifizierten sie insgesamt vier *Legionella* ORFs (*open reading frames*). Darunter befand sich ein 848bp-Fragment welches den C-terminalen Teil von VipD kodierte (As 341-613). In Anlehnung an diesen Phänotyp in transient transfizierter Hefe wurde das Protein VipD (für *vacuolar protein sorting (vps) inhibitor protein D*) genannt. Interessanterweise befindet sich die Patatindomäne nicht in dieser Proteinregion. Die Expression des gesamten PatA/VipD Proteins in *S. cerevisiae* verursachte einen wesentlich schwächeren *vps*-Inhibitor Phänotyp in Hefe (ca. 30% im Vergleich zum C-Terminus). Daraus kann gefolgert werden, dass die Patatindomäne nicht unmittelbar an der Etablierung des *vps*- Phänotyps beteiligt ist. Die Autoren diskutierten zwei mögliche Ursachen für den schwächeren Phenotyp des Gesamtproteins im Vergleich zur C-terminalen Hälfte. Zum einen könnte der N-Terminus, welcher die Patatindomäne enthält, den C-Terminus negativ regulieren. Zum anderen könnte die C-terminale Proteinhälfte in der Hefe wesentlich effizienter zu ihrem molekularen Zielort translokalisiert werden als das Gesamtprotein und dort ggf. effektiver seine Wirkung entfalten. Dieses Ergebnis zeigt, dass PatA/VipD mit dem Wirtszell-Vesikeltransport interagiert, die putative Phospholipasedomäne des Proteins hierfür jedoch keine direkte Rolle spielt. Die Dot/Icm Typ IVB abhängige Translokalisierung von VipD/PatA durch *L. pneumophila* JR32 in die Wirtszelle wurde in dieser Studie mit einer Adenylatcyclase (*cyaA*) Reportergenfusion gezeigt. CyaA ist Calmodulin-aktivierbar, so dass die Injektion von VipD-CyaA Fusionsproteinen durch *L. pneumophila* JR32 in Wirtszellen in Form erhöhter zellulärer cAMP Mengen nachweisbar war (128).

In der zweiten zu PatA/VipD existierenden Arbeit (228) wurde das Protein in einem Screen auf intrazelluläre Vermehrungsdefekte von *L. pneumophila* Lp01 (einem Thymidin-auxotrophen Abkömmling von *L. pneumophila* Philadelphia-1) miniTn10 Insertionsmutanten in Makrophagen identifiziert. Obwohl das Originalisolat eine miniTn10 Insertion im *patA/vipD* Gen trug und für das intrazelluläre Wachstum in Makrophagen attenuiert war, konnte die daraus zunächst postulierte essentielle Funktion des Proteins für die intrazelluläre Vermehrung nicht bestätigt werden. Weitere in der Studie generierte *L. pneumophila* Lp01 *patA/vipD* Deletionsmutanten waren zum Teil in der Lage, sich intrazellulär zu vermehren, zum anderen Teil jedoch nicht. Komplementationsexperimente des attenuierten Originalisolats blieben ohne Erfolg. Die Autoren folgerten aus dem gehäuften, jedoch nicht ausschliesslichen Auftreten attenuierter, nicht komplementierbarer *patA/vipD* Deletionsmutanten, dass das Ausschalten dieses Gens in *L. pneumophila* das Auftreten einer zweiten,

nicht identifizierten Mutation begünstigen könnte. Diese würde dann in Kombination mit dem Fehlen von PatA/VipD zur attenuierten intrazellulären Replikation führen können. Eine Ursache dafür, bzw. der selektive Druck, welcher das gehäufte Auftreten der *second-site* Mutation(en) bei *patA/vipD* Mutanten begünstigte, blieb unklar, zumal sie in Laborkulturmedien keinerlei nachweisbaren Wuchsdefekt zeigten. Die Arbeit belegte zusätzlich eine leichte Toxizität von PatA/VipD, wenn es in Hefe und humanen 293T- Zellen exprimiert wurde, und bestätigte durch Reportergenfusion die Dot/Icm abhängige Translokation des Proteins von Bakterien in Wirtszellen. In VanRheenen *et al.* (2006) wurden zudem durch Genomsequenzanalyse drei PatA/VipD-Paraloge auf dem *Legionella*-Chromosom identifiziert [(VpdA (PatC), VpdB (PatG), VpdC (PatF))] und zwei davon als Dot/Icm Substrate erkannt (VpdA, VpdB), jedoch nicht näher charakterisiert (228).

In keiner der beiden Studien wurde ein ursächlicher molekularer Wirkmechanismus hinter dem *vps*- Phänotyp in Hefe bzw. der leichten Zytotoxizität des Proteins gefunden. Biochemische Eigenschaften bzw. mögliche Substrate, sowie die intrazelluläre Lokalisation des Proteins wurden nicht charakterisiert. Die biologische Bedeutung der Patatindomäne des VipD/PatA Proteins blieben ebenfalls unklar.

2.6 Ziel der Arbeit

Vier lipolytische *Legionella pneumophila*-Enzyme mit teilweise überlappenden Enzymspezifitäten, PLA, LPLA und GCAT, wurden bereits charakterisiert. Eines (PlaB) kann keiner bekannten Gruppe lipolytischer Enzyme zugeordnet werden (73) und drei davon gehören zur Familie der GDSL Hydrolasen (PlaA, PlaC, PlaD) (15,16,70-72), und unpubliziert). Bei der Analyse der *L. pneumophila*-Genomsequenz zeigte sich überraschenderweise, dass alle bisher sequenzierten *L. pneumophila* Stämme zehn (Corby, Lens) bis elf (Philadelphia-1, Paris) zusätzliche Enzyme kodieren, die Homologie zu Vertretern eukaryontischer Phospholipasen besitzen. Aufgrund ihrer Ähnlichkeit zu Patatin wurden diese 11 Genprodukte als eine neue bakterielle Proteinfamilie der Patatin-ähnlichen Proteine (PLP) definiert (17), die putative Phospholipaseaktivität besitzt.

Ziel dieser Arbeit ist es, einen Überblick über die lipolytische Aktivität der *L. pneumophila* PLP zu erarbeiten. Dabei sollen für zwei PLP vertiefende Untersuchungen bezüglich der enzymatischen Aktivität und deren möglicher Rolle und Wirkmechanismen für die Infektion von Wirtszellen angestellt werden. Im Vordergrund soll die Charakterisierung des PLP PatA stehen (in anderen Arbeitsgruppen VipD benannt). Dazu sollen Mutanten generiert, und in etablierten Zellkultursystemen untersucht werden. Die lipolytische Aktivität von PatA soll durch rekombinante Expression und Aufreinigung des Proteins analysiert werden. Ein weiterer Fokus der Arbeit soll die intrazelluläre Lokalisation von PatA/VipD in Wirtszellen sein.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Laborausstattung

Tab. 3.1 Liste verwendeter Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Kulturschüttler	a) G25 incubator shaker	New Brunswick Scientific
	b) TH25	Edmund Bühler
Ultraschallgerät	Sonoplus	Bandelin
Sterilbänke	a) HeraSafe	Heraeus
	b) mikrobiologische Sicherheitskabine	Karl Bleymehl
Thermocycler	a) T-Gradient	Biometra
	b) FlexCycler	Analytic Jena
DC Kammer (TLC)	Glass Chamber, 35×25×12 cm	Desaga
UV-Transilluminator	Gel Doc 2000	Bio-Rad
<i>semidry</i> -Elektroblotter	TE77	Pharmacia
Absorptionsmessgerät	Tecan Sunrise	Tecan
Koloniezählgerät	Acolyte	Synbiosis
Elektroporationsgerät	Cell Porator	Gibco
FPLC	ÄKTAprime	Amersham
Inkubatoren	a) B20	Heraeus
	b) CO2-Inkubator	Heraeus
Mikroskope	a) DM IL Typ 090.135.002	Leica
	b) IMT	Olympus
	c) Axiovert 200M	Zeiss
	d) LSM 510 Meta	Zeiss
Kritischer Punkt Trockner	CPD 030	Balzers
Raster-Elektronenmikroskop	Leo 1530	Zeiss
Photometer	Beckman Photometer DU520	Beckman Coulter
Bakterien-Plattiergerät	Whitley Spiral Plater	dw Scientific
Protein Elektrophoresekammern	Mini Protean 3	Bio-Rad
Chemiluminiszenzmessgerät	Chemismart 3000	PeqLab
FT-IR Spektroskop	IFS 28/B	Bruker

3.1.2 Spezielle Materialien

Tab. 3.2 Liste spezieller Materialien

Material	Name/Beschreibung	Artikelnummer	Hersteller
Chromatografie Papier	17 CHR	3017915	Whatman
Filterröhrchen für Zentrifuge	a) Microcon XM-3	42404	Millipore
	b) Microcon XM-10	42407	
	c) Microcon XM-50	42409	

Material und Methoden

	d) Amicon 4, 10 kDa	UFC801024	
	e) Amicon Ultra-15, 30 kDa	UFC 903024	
Kieselgel Platten für DC	Kieselgel 60 WF254s	345.715	VWR
Elektroporationsküvetten	For Cell Porator (0.2 cm)	11608031	Biometra
Zellkulturflaschen	175cm ²	159910	Nunc
	75cm ²	178891	Nunc
	25cm ²	156367	Nunc
Zellkulturplatten	24-well	3911925	Greiner
Mikrotiterplatten	96-well	650001	Anicrin
Reagenzgläser für Bakterien	12.5 x 100 0,9mm AGR grade	192772119	NeoLab
Western Transfer Membran	Immobilon P SQ 10×10 (PVDF)	ISEQ 10100	Millipore
Nickel Sepharose Säulchen	HisTrap HP 1ml	17-5247-01	GE/ Amersham
Nickel Sepharose Säulchen	HisTrap HP 5ml	17-5248-01	
NHS-Sepharose Säulchen	HiTrap NHS act. columns	17-0716-01	
NHS-Sepharose Agarosebeads	NHS act. Sepharose	17-0906-01	
Objektträger	Superfrost geschnitten	1879.1	Roth
Objektträger Poly-L-Lysin	Diagnostikaobjektträger epoxy	L198.1	Roth
Dialyseschläuche	46mm breit, MWCO 6.000	E. 658.1	Roth
Deckgläschen	12mm Deckgläschen	P231.2	Roth
FTIR Probenrad	ZnSe Trägermaterial	A 501-B/3	Bruker

3.1.3 Verwendeter Chemikalien

Tab. 3.3 Liste verwendeter Chemikalien

Name	Artikelnummer	Hersteller
Agar	1.00063.1000	VWR
Agarose	V3125	Promega
Alamar-Blue	DAL-1025	Biosource
CHES	C-2885	Sigma-Aldrich
Chloroform	1.024.451.000	VWR
Coomassie Blue (Roti Blue)	A152.1	Roth
Diethyl Ether	1.009.211.000	VWR
di-Natrium Hydrogen Phosphat Heptahydrat	1.065.751.000	VWR
DMSO, Dimethylsulfoxid	20385	Merck
dNTPs PCR Nucleotide Mix 10 mM	US77212-500	Amersham
Essigsäure	1.00063.1000	VWR
Ethanol (100%)	1.009.741.011	VWR
Ethanolamin	8.99849.0100	Merck
Ethidium Bromid	1.116.080.030	VWR
Ficoll 400	437092S	VWR
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA/A-15-043	PAA
Freund's Adjuvans	77140	Pierce Biotechnology
Freund's Adjuvans incomplete	77145	Pierce Biotechnology
D-(+)-Glukose	G7021	Sigma-Aldrich
Glutardialdehyd (25% in H ₂ O)	G5882	Sigma-Aldrich
Glycerol 86%	7533.1	Roth

Material und Methoden

Glycin	G-8898	Sigma-Aldrich
Glycin (für Elektrophorese)	G-8898	Sigma-Aldrich
Gold-Palladium Partikel	E 5100	Polaron
HAT Medium Supplement	H0262	Sigma-Aldrich
Hefeextrakt	ADM Z45380	Oxoid
HEPES	H4034	Sigma-Aldrich
IPTG, Isopropyl b-D-thiogalactosid	I-6758	Sigma-Aldrich
Isopropanol	109634	VWR
Kalium Azetat	60035	Fluka Biochemika
Kalium Dihydrogen Phosphat	1.048.731.000	VWR
<i>Legionella</i> Agar Platte BCYE α	1860e	Heipha
<i>Legionella</i> Basis Agar	1.102.420.001	VWR
<i>Legionella</i> Growth Supplement	SR 0110C	Oxoid
Lysozym	L-7651	Sigma-Aldrich
Magnesium Chlorid Hexahydrat	1.05833.0256	Merck
Magnesium Sulfat Heptahydrat	1.058.861.000	VWR
Maleinsäure	8.170.581.000	VWR
2-Mercaptoethanol	115433	VWR
Metafectene	T020-0.2	Biontex
Methanol	1.060.092.500	VWR
Naphtol Blueblack	195243-100G	Sigma-Aldrich
Natrium Azetat	S-7653	Sigma-Aldrich
Natrium Azid	1.066.880.100	VWR
Natrium Chlorid	1.064.040.500	VWR
Natrium Citrat	S-4641	Sigma-Aldrich
Natrium EDTA	E-5134	Sigma-Aldrich
Natrium Hydroxid	1.064.691.000	VWR
Natrium Hypochlorid Lösung	1.056.142.500	VWR
Natrium Tartrat	S-4797-100g	Sigma-Aldrich
n-Hexan	1.043.671.000	VWR
NileRed	N3013	Sigma
Paraformaldehyd	8.187515.0100	Merck
PeqGOLD RNA Pure	30-1010	PeqLab
Petrol Ether (Reag. Ph Eur, Tm 50-70°C)	159.542.500	VWR
PMA, Phorbol-12-Myristate-13-Acetat	P-8139	Sigma-Aldrich
Polyethylenglycol (PEG 4000)	P-3390	Sigma-Aldrich
Ponceau S	P-7170	Sigma-Alrich
ProLong Gold Antifade	P36931	Invitrogen
ProLong Gold Antifade mit DAPI	P36931	Invitrogen
Protease-Inhibitor Mix FY	39104.02	Serva
Proteinase K	P-2308	Sigma-Aldrich
Proteose Pepton	ADM C66260	Oxoid
Rinder Serum Albumin (BSA)	A7638	Sigma-Aldrich
Rnase OUT Recombinant Rnase-Inhibitor	10777-019	Invitrogen

Material und Methoden

RNase-free Dnase, RQ1	M6101	Promega
Roti Nanoquant	K880.1	Roth
Roti-Load 1, (Reduzierender Protein-Ladepuffer)	K929.1	Roth
Roti-Load 2, (Nicht-reduzierender Protein-Ladepuffer)	K930.1	Roth
Roti-Nanoquant (Proteinbestimmung)	K880.1	Roth
RPMI 1640 Pulver	51800-043	Invitrogen
Saponin	S-4521	Sigma-Aldrich
SDS	L-4390	Sigma-Aldrich
SDS, Dodezylsulfat Natriumsalz	20763	Serva
Sicapent	1005430500	Merck
Saccharose	1.076.511.000	VWR
Tris	1.08382.1000	Merck
Tris Base	1.083.821.000	VWR
Tris-HCl	1.082.191.000	VWR
Triton X-100	T-8787	Sigma-Aldrich
Triton X-100	T-8787	Sigma-Aldrich
Trypan Blue (0.4%)	T-8154	Sigma-Aldrich
Trypanblau	T-8154	Sigma-Aldrich
Trypsin	L-8003	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA (0,05%/0,02%)	L11-004	PAA
Trypton	T-9410	Sigma-Aldrich
Tubulin (aus Rinderhirn)	TL238	Cytoskeleton
Tween20	8.170.721.000	VWR
X-gal, 5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-b-D-galactopyranoside	1161	Diagnostic Chemicals Ltd.
Ziegen Serum	PCN5000	Invitrogen
Zink Chlorid	1.088.160.250	VWR

Tab. 3.4 Liste verwendeter Lipide

Name	Abkürzung	Katalog	Hersteller
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phospho-rac-1-Glycerol	DPPG/PG	840455	Avanti
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholin	DPPC/PC	850355	Avanti
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phospho-Glycerol	MPLPG/LPG	858122	Avanti
1-Palmitoyl-2-Hydroxy-sn-Glycero-3-Phosphocholin	MPLPC/LPC	855675	Avanti
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-Phosphoethanolamin	DPPE/PE	805705	Avanti
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycerol	1,2-DG	800816	Avanti
1-Monopalmitoyl-rac-Glycerol	1-MPG	M-1640	Sigma-Aldrich
Palmitinsäure	FFA	P-0500	Sigma-Aldrich
1,2-Dipalmitoyl-sn-Glycero-3-[Phospho-L-Serin]	DPPS	160PS-36	Avanti

3.1.4 Verwendete Puffer und Lösungen

Tab. 3.5 Liste verwendeter Puffer/Lösungen

Name	Komponenten	Menge oder Konzentration
PBS (pH7.2)	KCl KH ₂ PO ₄ Na ₂ HPO ₄ NaCl H ₂ O bidest ad	0.2 g 0.2 g 1.15 g 8 g 1000 ml
SET	NaCl Tris-HCl EDTA	150mM 15mM, pH7.4 1mM
TE (pH8.0)	Tris-HCl Na ₂ EDTA	10 mM 1 mM
Protein Aufreinigung über His Tag		
Protein-Bindepuffer (pH8.0)	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol	20mM 500mM 20mM
Elutionspuffer (pH8.0)	NaH ₂ PO ₄ NaCl Imidazol	20mM 500mM 500mM
Lagerungspuffer für Protein	Glycerol	10% in PBS
Protein Kopplung an NHS Sepharose		
Waschpuffer A (pH8.3)	Ethanolamin NaCl	500mM 500mM
Waschpuffer B (pH4.0)	Na-Azetat NaCl	100mM 500mM
Kopplungspuffer (pH8.3)	NaHCO ₃ NaCl	200mM 500mM
Elutionspuffer (pH3.0)	Glyzin	100mM
Lagerungslösung (pH7.0)	Na ₂ HPO ₄ NaN ₃	50mM 0,1%
Protein Elektrophorese		
SDS PAGE Laufpuffer (10×)	Tris Base Glycine SDS H ₂ O bidest ad	30.3 g 144.0 g 10.0 g 1000 ml
Lyse- und Auftragspuffer	Tris Base DTT Bromphenolblau Glycerin	50mM 100mM 0,10% 10%

Material und Methoden

	SDS	2%
Dehydrationspuffer SDS Gele	Glycerol	50%
	Glycerin	3%
Western Blot		
Western Blot Transfer Buffer	Tris Base	25mM
	Glycin	192mM
	Methanol	10%
Waschpuffer (PBS-T)	Tween-20	0,1% in PBS
DNA Elektrophorese		
50×TAE (pH 8.0)	Tris-Base	2.0 M
	Acetic Acid	1.0 M
	Na ₂ EDTA	0.1 M
DNA Ladepuffer	Bromphenol Blue	0.07 % (w/v)
	Ficoll 400	20 % (w/v)
Fixierlösungen		
PFA	Paraformaldehyd	1,5g
	H ₂ O bidest 50°C	40ml
	NaOH	auf pH7 einstellen
	10×PBS	5ml
	H ₂ O bidest ad	50ml
Glutaraldehyd	HEPES	0.05M in H ₂ O
	Glutaraldehyd	10%

3.1.5 Verwendete Bakterien und Zellen

Tab. 3.6 Liste verwendeter bakterielle und eukaryontische Stämme

Stamm	Herkunft
Prokaryonten	
<i>Escherichia coli</i>	
DH5α	Invitrogen, #18258-012
BL21	Invitrogen, #C161003
Top10	Invitrogen, #C664-55
<i>L. pneumophila Sgl</i>	
130b	Stamm Wadsworth, ATCC BAA-74
Philadelphia-1	ATCC 33152
Eukaryonten	
U937 Makrophagen	ATCC CRL-1593.2
A549 Epithelzellen	ATTC CCL-185
X63 Myelomzellen	ATTC CRL-1580
<i>A. castellanii</i>	ATCC 30234

Material und Methoden

3.1.6 Verwendete Kulturmedien

a) Nährmedien für Bakterien

Als synthetisches Nährmedium für die Anzucht der *E. coli* Kulturen wurde Luria Bertani (LB) Komplexmedium verwendet. Für die Anzucht der *L. pneumophila* Kulturen wurde das heute übliche *Legionella*-Labormedium BCYE (*buffered charcoal yeast extract*) (60) verwendet.

Zusammensetzung der Nährmedien (Angaben jeweils je 1000ml)

LB-Flüssigmedium:

10g Trypton, 5g Hefeextrakt, 5g NaCl

LB-Agar:

Wie Flüssigmedium, jedoch mit 1,5% Agar.

Für den Nachweis von β -Galactosidase-Aktivität wurden ca. 1 Stunde vor der Ausplattierung der Bakteriensuspension 50 μ l X-Gal Stammlösung (2% X-Gal in N,N-Dimethylformamid) auf LB-Agarplatten gegeben (LB-X-Gal).

BCYE α -Festmedium:

27,5g *Legionella* Basis Agar (Merck/VWR, Kat. 1.10242), 14,45g *Legionella* Wachstums Supplement (Oxoid, Kat. SR110C)

27,5g *Legionella* Basis Agar enthalten: 10g Hefeextrakt, 1,5g Aktivkohle, 16g Agar

14,45g *Legionella* Supplement enthalten: 10g ACES Puffer, 2,8g KOH, 1,0g α -

Ketoglutarat-Monoessigsäure Salz, 0,4g L-Cystein HCL, 0,25g Eisen-Pyrophosphat

BYE-Flüssigmedium:

28,9g *Legionella* Wachstums Supplement, 10g Hefeextrakt

Nährmedien für die Elektroporation (Angaben je 1000ml)

SOB Medium (wie SOC Medium, jedoch ohne Mg^{++} und Glukose)

20g Trypton

5g Hefeextrakt

0,584g NaCl

0,186g KCl

ad ddH₂O 1000ml, mit NaOH auf pH 7.0 einstellen

SOC Medium

98ml SOB Medium, Zugabe von 1ml 2M Mg^{++} Stammlösung (20,33g $MgCl_2 \times 6H_2O$ und 24,65g $MgSO_4 \times 7H_2O$ je 100ml Mg^{++} Stammlösung) und 1ml 2M Glukose Stammlösung (36,04g Glukose je 100ml Stammlösung).

b) Nährmedien für Makrophagen, A549 Epithelzellen und *Acanthamoeba castellanii*

Acanthamoeba castellanii – Kulturmedium

20g Proteose Pepton (Oxoid, Hampshire, UK, Kat. ADM C66260)

1g Hefeextrakt (Oxoid, Kat. ADM Z45380)

900ml ddH₂O

10ml 400mM $MgSO_4 \times 7H_2O$

10ml 40mM $CaCl_2 \times 2H_2O$

10ml 250mM $Na_2HPO_4 \times 7 H_2O$

10ml 250mM KH_2PO_4

10ml 5mM $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2 \times 6H_2O$

2,5g NaCitrat $\times 2H_2O$

50ml 2M Glukose

Infektionsmedium für Co-Infektion *A. castellanii* mit *L. pneumophila*

Wie Kulturmedium, jedoch ohne Pepton, Hefeextrakt und Glucose.

Kulturmedium für humane U937-Makrophagen und A549 Epithelzellen

Die Kultur von U937-Makrophagen und A549 Epithelzellen erfolgte in RPMI 1640-Medium mit 10% fötalem Kälber Serum (FKS).

3.1.7 Antibiotika

Die Vorratslösungen der Antibiotika wurden durch Auflösung der angegeben Mengen im entsprechenden Lösungsmittel und anschliessender Sterilfiltration hergestellt. Die Vorratslösungen wurden aliquotiert bei -20°C gelagert und den Medien in den aufgeführten Konzentrationen zugesetzt.

Tab. 3.7 Liste verwendeter Antibiotika

Antibiotikum	Katalognummer	Hersteller
Ampicillin Natriumsalz	A-9518	Sigma-Aldrich
Chloramphenicol	C-1919/ C-0378	Sigma-Aldrich
Kanamycin Sulfat	K-1377	Sigma-Aldrich
Penicillin-Streptomycin	P-7539	Sigma-Aldrich

Tab. 3.8 Eingesetzte Konzentrationen der Antibiotika und anderer Chemikalien

Antibiotikum	Abkürzung	Vorratslösung	Endkonzentration für	
			<i>L. pneumophila</i> [µg/ml]	<i>E. coli</i> [µg/ml]
Ampicillin	(Amp)	100 g/l H ₂ O	Resistent	100
Chloramphenicol	(Cm)	30 g/l EtOH	3-9	30
Kanamycin	(Km)	50 g/l H ₂ O	25	50
IPTG		100 mM in H ₂ O	---	1 mM
X-gal		10 mg/ml	---	100 µl
Penicillin-Streptomycin	(Pen/Strep)	10mg/ml Strep 10.000U/ml Pen in 0,9% NaCl	Für Hybridomanzucht: 100µg/ml Strep + 100U/ml Pen	

3.1.8 Verwendete Enzyme

a) Restriktionsendonukleasen

Alle Restriktionsenzyme wurden bei New England Biolabs erworben (Ausnahme: DpnI, Teil des "QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit" von Stratagene).

Tab. 3.9 Liste verwendeter Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Katalognummer	Restriktionsenzym	Katalognummer
AccI	R0161	KpnI	R0142
AfeI	V0213	MfeI	R0589
ApaI	R0114	PstI	R0140
AvaI	R0152	SacI	R0156
AvaII	R0153	SacII	R0157
DpnI	200519	SfoI	R0606
HincII	R0103	SmaI	R0141
HindIII	R0104	SpeI	R0133
EcoRI	R0101	SphI	R0182
EcoRV	R0195	XbaI	R0145

b) Verwendete Polymerasen

Tab. 3.10 Liste verwendeter Polymerasen

Name	Katalognummer	Hersteller
Platinum-Taq DNA High Fidelity	11304-011	Invitrogen
<i>Pfu</i> DNA Polymerase, Rekombinant	EP0501	MBI Fermentas
Taq DNA Polymerase	M0267L	New England Biolabs
Klenow Fragment	M0210S	New England Biolabs

Tab. 3.11 Liste weiterer verwendeter Enzyme

Enzym	Katalognummer	Hersteller
DNaseI	79254	Qiagen
Lysozym	L-7651	Sigma-Aldrich
Protein Kinase K	P-2308	Sigma-Aldrich
RNase	R-7003	Sigma-Aldrich
Benzonase	70746	Novagen
T4 DNA Ligase	M0202	New England Biolabs

3.1.9 Verwendete Kits

Tab. 3.12 Liste verwendeter Kits

Name	Katalognummer	Hersteller
BigDye Terminator V. 3.1 Ready Cycle Sequencing Kit	4337035	Applied Biosystems
Nefa C Kit	994-75409	Wako Chemicals
OneStep RT-PCR Kit	210212	Qiagen
pGEMTeasy Kit	A1360	Promega
Rneasy Mini Kit	74104	Qiagen
Wizard SV Gel und PCR cleanup system	A9282	Promega
Wizard Plus Minipreps	A1460	Promega
Champion pET directional TOPO expression Kit	K160-01	Invitrogen
QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit	200519	Stratagene
EZ-Tn5 <KAN-2> Transposome Kit	TSM99K2	Epicentre
ECL Western Reagents	RPN2106	Amersham Biosciences
Silver Staining Kit, Protein	17-1150-01	Amersham Biosciences

3.1.10 Verwendete Antikörper

Tab. 3.12 Liste verwendeter Antikörper

Spezifität/Bezeichnung	Spender	Konjugat	Katalognummer	Hersteller
Western Blot				
Anti-GAPDH cl. 71-1monok.	Maus	-	G8795	Sigma-Aldrich
Anti-PatA Klon85/7 monok.	Maus	-	generiert in dieser Arbeit (3.2.11.1)	
Anti- α Tubulin monok.	Maus	-	T9026	Sigma-Aldrich
Anti-GFP cl. GSN-24 monok.	Maus	-	G6795	Sigma-Aldrich
Anti-PatA H39	Hühnchen	-	generiert in dieser Arbeit (3.2.11.2)	
Anti-Hühnchen IgY	Kaninchen	HRP	A9792	Sigma
Anti-Maus	Ziege	HRP	A9044	Sigma-Aldrich
Immunfluoreszenzmikroskopie				
Anti- <i>Legionella</i>	Kaninchen	-	BP2021	Acris

Material und Methoden

Anti-Pan-Cadherin	Kaninchen	-	C3678	Sigma
Anti-PatA H39	Hühnchen	-	generiert in dieser Arbeit (3.2.11.2)	
Anti-Kaninchen	Ziege	Alexa Fluor 594	A11012	Invitrogen
Anti-Hühnchen IgY	Ziege	Alexa Fluor 568	A11041	Invitrogen

3.1.11 Verwendete Vektoren

Tab. 3.13 Liste verwendeter Vektoren

Name	Katalognummer	Hersteller
pET-28b	69865-3	Stratagene
pGEMTez	A1360	Promega
pBCKS+	212217	Stratagene
pMMB2002	-	(184)
pLM845= pLAW344+rpoS _{JR32}	-	(93)
pEGFP-C2	6083-1	Clontech
pET160/GW/D-TOPO	K160-01	Invitrogen

3.1.12 Verwendete Oligonukleotide

a) PCR und Klonierungsprimer

Tab. 3.14 Übersicht verwendeter PCR und Klonierungsprimer, Alle Primerpaare wurden 50pmol/μl in PCR Reaktionen eingesetzt (siehe 3.2.3).

Pr. Nr.	Name	Länge	Sequenz	Partner:
70	kan_a1_f	21	GACGCTCAGTGGAACGAAAAC	71
71	kan_b1_r	20	ATGTGCGCGGAACCCCTATT	70
72	KAN-2FP-1	25	ACCTACAACAAAGCTCTCATCAACC	73
73	KAN-2RP-1	25	GCAATGTAACATCAGAGATTTTGAG	72
148	pat003_fw	19	CCT GCT GCC CTG GAG AAA C	149
149	pat003_rev	21	TGT CGC TGC AGT AAT GGT GTC	148
150	pat161_fw	24	TTA TTT CAG GGG TTT CTA TTG GTG	151
151	pat161_rev	22	AGC GGT TGC ATT TTC TTC ATC T	150
152	pat187_fw	24	GAT TGG GTG TAA GGA TTG ATT GTG	153
153	pat187_rev	22	TCC GGT CCT GCA TTA TTT TGA T	152
156	pat270_fw	24	GAG CCT ATC AAT TTG GTG TGG TTA	157
157	pat270_rev	23	TCG AGA AAG ATT GTT GGG TGA CT	156
158	pat4500_f	23	TCAGAACAGCGACTTGGGTAGGA	159
159	pat4500_r	24	CAGGATGATGATGCGGTAGAAGTG	158
160	pat459_fw	19	GTC GCT TGC GGT GGC TCA G	161
161	pat459_rev	21	GCG CAG TCG TTA CGG AAA TGG	160
163	pat527_fw	22	GCA TGC AGC TTT CAG GGA GGA G	164
164	pat527_rev	23	GAA CCA GCG AAA TAG CGG AAG GA	163
167	pat545_fw	24	GGA TTT AAA GAG GTA CGC ACT GAA	168
168	pat545_rev	22	AAC CTT TTA CCG CTT TGG AAT A	167
169	pat619_fw	24	CCT ATT GCC TTT GAG CGT ATC TGC	170

Material und Methoden

170	pat619_rev	24	CAT GCC CTT CAA AAC TCC ACT GTC	169
171	pat656_fw	21	GAC CGC GCT GGA TTA TGC TAT	172
172	pat656_rev	23	TTC CTG GCT GTG ATT ATG ATG CT	171
173	pat907_fw	23	TTA ATA AAT CAC AGC AAA AGG AA	174
174	pat907_rev	24	AGA TGA CTA ATA AAA GAC CAC TCG	173
175	patA_2500f	19	GGATCCCCCACTAAATGAT	176
176	patA_2500r	21	TCTAGAGGATAAATGGCAGTT	175
188	patAT_fw	25	CACCTTGAAACTTGCTGAAATTATG	189, 1078
189	patAT_rev	20	GGTGTAACCGCCGGTAATT	188, 1101
285	RTgyr_alf	21	CACATATGGCCGGCTTTAGAG	286
286	RTgyr_blr	19	TCGCGCTTGTTTTGCTGAG	285
378	Inv-1	25	ATGGCTCATAACACCCCTTGTATTA	379
379	Inv-2	25	GAACCTTTGCTGAGTTGAAGGATCA	378
412	patE_To_fw	24	CACCATGCTATACTTGCTGATACA	413
413	patE_To_rv	23	CAGCAGCAATGTAATAGTGGATG	412
414	patH_To_fw	22	CACCATGACAAATCAATACCCT	415
415	patH_To_rv	21	ATTGGATTCTTTTGGCATAGC	414
499	patAProXba_fw	26	ACTACATGCTTCTAGAGGTTTCGAGGA	502
502	patAStopXba_rv	30	ATAAACTAATATCTAGAACAGAGTTAATGG	499
619	patAPst_fw	28	GAAATTAAGTGCAGTTTGAAACTTGCTG	620
620	patAPst_rv	30	ATAAACTAATCTGCAGAACAGAGTTAATGG	619
621	patAPst_2_fw	28	ATTAAGTGCAGTAATAAACTATACGAA	624
622	patAPro2Sac_fw	25	GGTTTACAGCTCTGTGGGTCTTCTT	623
623	patAPro2Xba_rv	27	CTTTTTGTCTAGATTTTCAGCAAGTTTG	622
624	patAgfp2Xba_rv	30	ATAAACTAATATGTAGTCTAGAGGTAATGG	621
630	patDTo_rv	24	CAGGCTGAATCCACCAAATACACA	1081
631	patFTo_fw	26	CACCAGACGTAAGGATTTACTGATGA	632
632	patFTo_rv	20	TGCGCTTCCAGGTTTACTTA	631
633	patGTo_fw	24	CACCATGAAAACGGTAAATAGTCA	634
634	patGTo_rv	18	GCCCGGGACGCCATTTAT	633
635	patITo_fw	26	CACCTTGCATCTTTGCCTTATACTTA	636
636	patITo_rv	24	ACGACTGTTTTGAGGTATCTGTGC	635
638	patJTo_rv	22	CTTCATCAGCCCGTAATCCATC	1089
639	patKTo_fw	22	CACCATGAGTTTGGAAGTGGAG	640
640	patKTo_rv	19	ATGCAGCGCCTCTTTGATG	639
694	2316Sac1_fw	26	ATTACCTCCCTTGAGCTCAACTCTCT	695
695	2316XbaStop_rv	30	GATTTTTTATCTAGAGTCATGGTTGTTTAC	694
885	RTlpg2315_fw	20	AGGGATATCAACCACTACGA	886, 951
886	RTlpg2315_rv	24	AATAATAATAGGGGTAGCCACTGT	885
887	RTlpg2319_fw	20	GGGGAAAGCATGGGGAATAG	888
888	RTlpg2319_rv	20	CATCGGTGTGGCCTTGAATA	887
889	RTlpg2320_fw	24	GTTTATGATCGCTTGAGTTTATT	890
890	RTlpg2320_rv	20	ATCCTGCTATCGCCATTTTT	889
900	RTlpg2318_fw	20	CAAAGCAAGCCTCCAATGAT	901

Material und Methoden

901	RTlpg2318_rv	20	AGCGATAGGCCCAACAAAAC	900
951	lpg2318Xba1_rv	26	AACCCCTTCTAGACTTGCTTTACTGAG	885
1078	patAK492_Pst1_rv	26	TGC AGA CTG CAG AGG CCT TCT ATT TC	188
1081	PatDTo2_fw	28	CAC CTC AAC AAC CAT GAC TCG AAC TAA A	630
1082	patBTo2_fw	21	CAC CTC AAA CAT GAT GGT TAA	1083
1083	patBTo2_rv	24	TGG ATT AGG TAT GTT AGT AGA GCA	1082
1084	patCTo2_fw	21	CAC CAT GAA AAC AAA GCA AGA	1085
1085	patCTo2_rv	20	TCC AAA ACA AGG CAG AAA GA	1084
1089	patJTo2_fw	28	CAC CTC AAG GAA AAT TAT GAA AAG GAT T	638
1101	PatA_CtermPst_fw	28	CAA GAA CAA ATC TGC AGT GAA ATG AAT G	189

b) Mutageneseprimer

Tab. 3.15 Liste verwendeter Mutageneseprimer. Alle Mutageneseprimer wurden mit dem „QuickChange site directed mutagenesis Kit“ von Stratagene verwendet.

Primer Nr.	Name	Länge	Sequenz
737	patA_S73A_sens	38	CTGACCCATGTTAGCGGAGCAGCTGCCGGAG CAATGAC
738	patA_S73A_as	38	GTCATTGCTCCGGCAGCTGCTCCGCTAACA TGGGTCAG
1072	2316g34t_sense	39	ATAAAGTCGCTATTGTTACATGAGCAGCAAGCG GAATTG
1073	2316g34t_asense	39	CAATTCGCTTGCTGCTCATGTAACAATAGCGA CTTTAT
1102	pBCa44c	38	GGCGGCCATTACCTCTAGATTTACGAAG GAGATATACA
1103	pBCa44c_antisense	38	TGTATATCTCCTTCGTAAATCTAGAGGTA ATGGCCGCC
1104	gfp_a711c_sense	41	CATGGCATGGATGAACTATACAAATACA TGTCGAGACCTGC
1105	gfp_a711c_antisense	41	GCAGGTCTCGACATGTATTTGTATAGTTC ATCCATGCCATG

3.1.13 Verwendete Standards

Tab. 3.16 Liste verwendeter DNA und Proteinstandards

Standard	Bereich	Kat.Nr.	Hersteller
DNA			
Gene Ruler DNA Laddermix	0,1-10kb	SM0331	Fermentas
Quick Load 1kb DNA Ladder	0,5-10kb	N0468G	New England Biolabs
Protein für SDS PAGE			
PageRuler unstained	10-200kDa	SM0661	Fermentas
Protein für Western Blot			
Magic Mark XP	20-220kDa	LC5602	Invitrogen
Biotinylated SDS PAGE Std.	6,5-200kDa	161-0319	BioRad
Avidin HRP Konjugat		170-6528	BioRad

3.1.14 Generierte Plasmide

Tab. 3.17 Liste der generierten Plasmide (alle klonierten Gene entstammen *L. pneumophila* Philadelphia-1). # Konstrukt enthält putative native Promoterregion, identifiziert mit dem Programm BPROM, * Am Konstrukt wurden Punktmutationen vorgenommen.

Name	Konstrukt	Insert [kb]	Marker	Primer und Klonierungsstrategie
pPA12	pET160+ <i>patA</i>	1,9	Amp	Primer 188/189 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA14	pGEMT+ <i>patA</i> #	4,5	Amp	Primer 159/160, TA Kloniert
pPA19	pMMB2002+ <i>patA</i> #	3,9	Chl	<i>patA</i> Fragment aus pPA14 Subkloniert in pMMB2002 über PstI
pPA20	pET160+ <i>patE</i>	1,1	Amp	Primer 412/413 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA22	pLM845+ <i>patA</i>	2,5	Chl	Primer 175/176 über XmaI/NotI (Klenow)
pPA25	pBCKS+ <i>Pmip</i> + <i>patA</i>	2,0	Chl	Primer 499/502 über XbaI hinter <i>Pmip</i> kloniert
pPA31	pBCKS+ <i>PpatA</i> + <i>gfp</i> #	0,5	Chl	Primer 622/623 über SacI/XbaI
pPA33	pBCKS+ <i>patA</i> + <i>gfp</i> #	2,6	Chl	Primer 499/624 über XbaI
pPA34	pBCKS+ <i>lpg2316</i> #	0,9	Chl	Primer 694/695 über SacI/XbaI
pPA35	pET160+ <i>patG</i>	1,8	Amp	Primer 633/634 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA37	pET160+ <i>patI</i>	1,1	Amp	Primer 635/636 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA39	pET160+ <i>patK</i>	1,2	Amp	Primer 639/640 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA40*	pBCKS+ <i>patA</i> + <i>gfp</i> #	2,6	Chl	Subkonstrukt von pPA33 <i>patA</i> Stopkodon mutiert (TAA->TAC), Mutageneseprimer: 44c_sense/a44c_as C-terminale PatA-GFP Fusion
pPA41*	pBCKS+ <i>PpatA</i> + <i>gfp</i> #	0,5	Chl	Subkonstrukt von pPA31, <i>gfp</i> Stopcodon mutiert (TAA->TAC), (Mutageneseprimer: <i>gfp</i> _a711c_s/ <i>gfp</i> _a711c_as)
pPA44	pBCKS+ <i>gfp</i> + <i>patA</i> #	2,6	Chl	Primer 621/620 über PstI N-terminale GFP-PatA Fusion
pPA45*	pBCKS+ <i>Pmip</i> + <i>patAS73A</i> #	2,0	Chl	Subkonstrukt von pPA25, mutiertes Serin-73-Alanin (TCT->GCT) (Mutageneseprimer: <i>patAS73A</i> _sense/ <i>patAS73A</i> _as
pPA46	pET160+ <i>patAS73A</i>	2,0	Amp	Primer 188/189 aus pPA45 amplifiziert und über pET160 TOPO Schnittstelle kloniert
pPA49	pBCKS+ <i>lpg2316</i> + <i>lpg2317</i> #	2,4	Chl	Primer 694/951 über XbaI/SacI
pPA51	pET160+ <i>patF</i>	2,7	Amp	Primer 631/632 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA52	pET160+ <i>patH</i>	0,9	Amp	Primer 414/415 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA54	pEGFP-C2+ <i>patA</i>	1,9	Kan	Primer 619/620 über PstI

Material und Methoden

pPA56	pEGFP-C2+ <i>patAK492Stop</i>	1,5	Amp	Primer 619/1078 über PstI
pPA58*	pBCKS+ <i>lpg2316+lpg2317#</i>	2,4	Amp	Subkonstrukt von pPA49, Stopkodon in <i>lpg2316</i> eingefügt (G(34)GA->TGA), (Mutageneseprimer: g34t sense/g34t as)
pPA59	pET160+ <i>patB</i>	1,1	Amp	Primer 1082/1083 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA60	pET160+ <i>patC</i>	2,0	Amp	Primer 1084/1085 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA61	pET160+ <i>patD</i>	1,2	Amp	Primer 1081/630 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA62	pET160+ <i>patJ</i>	1,2	Amp	Primer 1089/638 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA63	pET160+ <i>patAK492Stop</i>	1,5	Amp	Primer 188/1078 über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA64	pET160+ <i>patAS73AK492Stop</i>	1,5	Amp	Primer 188/1078 aus pPA45 amplifiziert, kloniert über pET160 TOPO Schnittstelle
pPA65	pEGFP-C2+ <i>patAnurCTerminus</i>	0,5	Kan	Primer 1101/620 über PstI

3.1.15 Generierte gentechnisch veränderte Organismen (GVO)

Tab. 3.18 *L. pneumophila* Philadelphia-1 Gene, die in *E. coli* eingebracht wurden

Akzeptor <i>E. coli</i>	Konstrukt	Vektor(ORF)	GVO	Klon
Top10	pPA12	pET160+ <i>patA</i>	Top10(pPA12)	1
BL21	pPA20	pET160+ <i>patE</i>	BL21(pPA29)	1
DH5a	pPA19	pMMB2002+ <i>patA</i>	DH5a(pPA19)	4
DH5a	pPA22	pLM845+ <i>patA</i>	DH5a(pPA22)	2
DH5a	pPA25	pBCKS+ <i>patA</i>	DH5a(pPA25)	1
DH5a	pPA31	pBCKS+ <i>PpatA+gfp</i>	DH5a(pPA31)	3
DH5a	pPA33	pBCKS+ <i>patA+gfp</i>	DH5a(pPA33)	1
DH5a	pPA34	pBCKS+ <i>lpg2316</i>	DH5a(pPA34)	1
Top10	pPA35	pET160+ <i>patG</i>	Top10(pPA35)	1
BL21	pPA35	pET160+ <i>patG</i>	BL21(pPA35)	1
DH5a	pPA36	pET160+ <i>patH</i>	DH5a(pPA36)	2
BL21	pPA36	pET160+ <i>patH</i>	BL21(pPA36)	1
Top10	pPA37	pET160+ <i>patI</i>	Top10(pPA37)	3
BL21	pPA37	pET160+ <i>patI</i>	BL21(pPA37)	1
Top10	pPA38	pET160+ <i>patJ</i>	Top10(pPA38)	1
BL21	pPA38	pET160+ <i>patJ</i>	BL21(pPA38)	1
Top10	pPA39	pET160+ <i>patK</i>	Top10(pPA39)	1
BL21	pPA39	pET160+ <i>patK</i>	BL21(pPA39)	1
DH5a	pPA40	pBCKS+ <i>patA+gfp</i>	DH5a(pPA40)	1
DH5a	pPA41	pBCKS+ <i>PpatA+gfp</i>	DH5a(pPA41)	1

Material und Methoden

DH5a	pPA44	pBCKS+ <i>gfp</i> + <i>patA</i>	DH5a(pPA44)	1
DH5a	pPA45	pBCKS+ <i>patAS73A</i>	DH5a(pPA45)	1
Top10	pPA46	pET160+ <i>patAS73A</i>	Top10(pPA46)	1
BL21	pPA46	pET160+ <i>patAS73A</i>	BL21(pPA46)	1
DH5a	pPA49	pBCKS+ <i>lpg2316+lpg2317</i>	DH5a(pPA49)	9
Top10	pPA51	pET160+ <i>patF</i>	Top10(pPA51)	1
BL21	pPA51	pET160+ <i>patF</i>	BL21(pPA51)	1
Top10	pPA52	pET160+ <i>patH</i>	Top10(pPA52)	1
BL21	pPA52	pET160+ <i>patH</i>	BL21(pPA52)	1
Top10	pPA53	pET160+ <i>patJ</i>	Top10(pPA53)	2
DH5a	pPA56	pEGFP-C2+ <i>patAK492Stop</i>	DH5a(pPA56)	1
DH5a	pPA58	pBCKS+ <i>lpg2316+lpg2317</i>	DH5a(pPA58)	1
Top10	pPA59	pET160+ <i>patB</i>	Top10(pPA59)	1
BL21	pPA59	pET160+ <i>patB</i>	BL21(pPA59)	1
Top10	pPA60	pET160+ <i>patC</i>	Top10(pPA60)	1
BL21	pPA60	pET160+ <i>patC</i>	BL21(pPA60)	1
Top10	pPA61	pET160+ <i>patD</i>	Top10(pPA61)	1
BL21	pPA61	pET160+ <i>patD</i>	BL21(pPA61)	1
Top10	pPA62	pET160+ <i>patJ</i>	Top10(pPA62)	1
BL21	pPA62	pET160+ <i>patJ</i>	BL21(pPA62)	1
Top10	pPA63	pET160+ <i>patAK492Stop</i>	Top10(pPA63)	1
BL21	pPA63	pET160+ <i>patAK492Stop</i>	BL21(pPA63)	1
Top10	pPA64	pET160+ <i>patAS73AK492Stop</i>	Top10(pPA64)	1
BL21	pPA64	pET160+ <i>patAS73AK492Stop</i>	BL21(pPA64)	1
DH5a	pPA65	pEGFP-C2+ <i>patACTerminus</i>	DH5a(pPA65)	1
DH5a	pPA54	pEGFP-C2+ <i>patA</i>	DH5a(pPA54)	3
DH5a	pPA67	pGEMT+ <i>lpg2830::knR</i>	DH5a(pPA67)	3

Tab. 3.19 *L. pneumophila* Philadelphia-1 Gene, die in *L. pneumophila* eingebracht wurden

Akzeptor <i>L. pneumophila</i>	Vektor	Vektor(ORF)	GVO	Klon
Phila-1	pPA19	pMMB2002+ <i>patA</i>	Phila-1(pPA19)	1
Phila-1 <i>patA</i> -	pPA19	pMMB2002+ <i>patA</i>	Phila-1 <i>patA</i> -(pPA19)	4-1
Phila-1	pPA22	pLM845+ <i>patA</i>	Phila-1 (pPA22)	1
Phila-1 <i>patA</i> -(K1-8)	pPA22	pLM845+ <i>patA</i>	Phila-1 <i>patA</i> -(pPA22)	1
Phila-1	pPA25	pBCKS+ <i>patA</i>	Phila-1 (pPA25)	2
Phila-1 <i>patA</i> -(K1-8)	pPA25	pBCKS+ <i>patA</i>	Phila-1 <i>patA</i> -(pPA25)	1
Phila-1	pPA31	pBCKS+ <i>PpatA+gfp</i>	Phila-1 (pPA31)	1
Phila-1 <i>lpg2316/17</i> -	pPA34	pBCKS+ <i>lpg2316</i>	Phila-1 D12(pPA34)	1
Phila-1	pPA40	pBCKS+ <i>patA+gfp</i>	Phila-1 (pPA40)	1

Material und Methoden

Phila-1 <i>patA</i> -(K1-8)	pPA40	pBCKS+ <i>patA</i> + <i>gfp</i>	Phila-1 <i>patA</i> -(pPA40)	1
Phila-1	pPA44	pBCKS+ <i>gfp</i> + <i>patA</i>	Phila-1 (pPA44)	1
Phila-1	pPA34	pBCKS+ <i>lpg2316</i>	Phila-1 (pPA34)	1
Phila-1 <i>lpg2316/17-</i>	pPA49	pBCKS+ <i>lpg2316</i> + <i>lpg2317</i>	Phila-1 D12(pPA49)	1
Phila-1	pPA49	pBCKS+ <i>lpg2316</i> + <i>lpg2317</i>	Phila-1 (pPA49)	1

Tab. 3.20 *L. pneumophila* knockout Mutanten

Akzeptor <i>L. pneumophila</i>	Insert	Mutagenesekonstrukt	GVO	Klon
Phila-1	<i>knR</i>	pGEMT+ <i>patA::knR</i>	Phila-1 <i>patA</i> -	1-8
130b	<i>knR</i>	pGEMT+ <i>patA::knR</i>	130b <i>patA</i> -	4

3.1.16 Verwendete Software

Tab. 3.21 Liste verwendeter Software

Software	Quelle
NCBI Blast:	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/
<i>Legionella</i> Genome Projekt Website:	http://genome3.cpmc.columbia.edu/~legion/
SignalP	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
DNA Star Inc.	EditSeq, PrimerSelect, SeqMan, MapDraw, MegAlign
Pedant Website	http://pedant.gsf.de/
PSORTb version 2.0	http://psort.org/
BPRom	www.softberry.com
MaliP	www.softberry.com
TIGR-CMR	http://cmr.jcvi.org/
Quantity One	Bio-Rad Laboratories
Software für Koloniezählung	Acolyte
Software FTIR Messung	OPUS Version 5.0
Magellan V5.03	Tecan
FPLC Software	PrimeView&PrimeView Evaluation
Software für Bildaufnahme und Bearbeitung	
Zeiss Axiovision V.2.1	Zeiss
Zeiss LSM META V.3.2 SP2	Zeiss
LSM Image Browser V.3.2	Zeiss

3.2 Methoden

3.2.1 Anzucht von Bakterien

3.2.1.1 *Legionella pneumophila*

Die Anzucht der Legionellen erfolgte auf BCYE α Agar bei 37°C. Nach dem Auftauen der bei -70°C (in 50% BYE-Boullion, 50% Glycerol) gelagerten Legionellen wurden diese auf BCYE α Agar ausgestrichen („Mutterplatte“) und nach 1 bis 2 Tagen wiederum auf BCYE α Agar überimpft („Tochterplatte“). *L. pneumophila* Mutanten wurden auf Antibiotika-haltigen Mutterplatten gelagert und zur Verwendung auf BCYE α Platten ohne Antibiotikum kultiviert.

Für Infektionen wurden diese Kulturen für 2 bis 3 Tage inkubiert. Für Flüssigkulturen wurden die Vorkulturen auf Festmedium für 1 bis 2 Tage bei 37°C inkubiert und anschließend zum Animpfen von BYE-Nährbouillon verwendet. Flüssigkulturen, die zur Herstellung von Zellpelletlysaten und Kulturüberständen für Aktivitätstests kultiviert wurden, wurden nicht direkt von BCYE α -Platten angeimpft. Hierfür wurden Vorkulturen in BYE-Flüssigmedium angesetzt, die bis zum Erreichen der mittleren bis späten exponentiellen Phase bei 37°C unter Schütteln (360rpm) kultiviert wurden (OD₆₆₀ ca. 1,8) und anschließend zum Animpfen der Hauptkulturen verwendet wurden.

Flüssigkulturen wurden in BYE-Boullion bei 37°C unter ständigem Schütteln mit 350 rpm inkubiert. Das Wachstum der Kulturen wurde photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 660nm (OD₆₆₀) verfolgt. Die Kulturen wurden vor Beginn der Inkubation auf eine OD₆₆₀ von 0,3 eingestellt und anschließend für 6 bis 9 Stunden oder länger inkubiert. Nach dem Erreichen einer Kulturdichte (OD₆₆₀) von 2,0 bis 2,2 (evtl. Abweichungen werden im Ergebnisteil erwähnt) wurde die Inkubation gestoppt und die Kultur, je nach Experiment, weiter verarbeitet.

3.2.1.2 *Escherichia coli*

Die Anzucht der bei -70°C (in 50% LB-Boullion, 50% Glycerol) gelagerten *E. coli* (DH5 α oder BL21) erfolgte auf LB-Agar bei 37°C für 15 bis 24 Stunden. Die gewachsenen Kulturen wurden zum Animpfen von Flüssigkulturen verwendet. Flüssigkulturen wurden in LB-Boullion bei 37°C und unter ständigem Schütteln bei 350rpm über Nacht bzw. bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von 2,0 bis 2,2 kultiviert. Die Kulturen wurden zu Beginn mit einer OD₆₆₀ von 0,15 bis 0,2 angeimpft. Sofern Flüssigkulturen während des Wachstums zur Induktion der Expression eines *in trans* enthaltenden Gens IPTG zugegeben wurde, wurde dies in einer Konzentration von 1mM bei einer OD₆₆₀ der Kultur von 0,8 bis 1,0 (frühe

Material und Methoden

exponentielle Phase) getan. Die Kultur wurde anschließend für weitere 4 bis 6 Stunden inkubiert.

3.2.2 Anzucht von Makrophagen, Epithelzell- und *Acanthamoeba* Zellkulturen

Die in flüssigem Stickstoff in Kulturmedium (RPMI bzw. PYG) + 10%DMSO eingefrorenen Zellen wurden zügig bei 37°C im Brutschrank aufgetaut und 2min bei 1000×g abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in Kulturmedium suspendiert und erneut bei 1000×g für 10min zentrifugiert (Wasch-Schritt). Die Zellen wurden daraufhin erneut in Kulturmedium resuspendiert (10ml) und in ein Kulturgefäß überführt. Nach 3 (*A. castellanii*) bzw. 10 Tagen Inkubation (U937, A549) bei 37°C und 5% CO₂ wurden die Zellen passagiert. Anschliessend wurden die Zellen in Intervallen von 3 bis 4 Tagen und Ratios von 1:8 bis 1:10 (v/v) regelmässig passagiert und der jeweiligen Verwendung (Infektionsexperimente, Gewinnung von Zelllysaten) zugeführt. Die Zellen wurden maximal 30 mal passagiert.

3.2.3 Grundlegende Nukleinsäure-Techniken

3.2.3.1 Isolierung genomischer DNA

Legionella pneumophila

Präparativ

Von der 2 Tage inkubierten Agarplatte mit *L. pneumophila* wurde mit einer sterilen Impföse Koloniematerial abgenommen und in 1ml PBS resuspendiert. Nach Abzentrifugation für 2min bei 5000×g wurde das Pellet in 0,5ml SET aufgenommen, mit 50µl Lysozym (10mg/ml), 5µl RNase (100mg/ml) für 30min bei 37°C inkubiert. Dem Lysat wurde anschließend 60µl 10% SDS sowie 3µl Proteinase K (18,6mg/ml) zugegeben und durch vorsichtiges Umdrehen homogenisiert. Anschließend wurde unter gelegentlichem Wenden 2 Stunden bei 55°C inkubiert. Daraufhin wurden 210µl 6M NaCl und 850µl Chloroform zugegeben und für 60min bei Raumtemperatur unter Rotation (Rotator) inkubiert. Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Minuten bei 6000×g. Die wässrige Phase wurde abpipettiert und mit 1Volumen Isopropanol versetzt. Die nach vorsichtigem Mischen weiß ausgefallene DNA wurde 10 min abzentrifugiert. Nach Verwurf des Überstandes wurde das Pellet mit 500µl 70% Ethanol gewaschen und anschließend erneut 10min abzentrifugiert. Das Pellet wurde abschließend bei 37°C getrocknet und in 50µl TE resuspendiert. Die isolierte DNA von *L. pneumophila* wurde zur Suspendierung der genomischen DNA vor Verwendung über Nacht bei 4°C gelagert.

Analytisch

Die Isolierung genomischer DNA von *L. pneumophila* zu analytischen Zwecken erfolgte mit dem „DNA Isolation Reagent for Genomic DNA“ der Firma AppliChem. Dieses basiert auf der Methode von Chomczynski (1987) (40). Die Zellen werden in einer guanidinhaltigen Lösung lysiert, welche RNA hydrolysiert und so die selektive Ausfällung von DNA mit Ethanol erlaubt. Die Isolierungen wurden den Angaben des Herstellers folgend durchgeführt.

3.2.3.2 Isolierung extrachromosomaler DNA

Die Plasmidisolierungen aus *E. coli* wurden mit Hilfe des „Plasmid miniprep Kit“ der Firma Qiagen durchgeführt. Die Isolierungen erfolgten mit 12 bis 16 Stunden kultivierten Flüssigkulturen den Angaben des Herstellers folgend.

3.2.3.3 RNA-Isolierung

Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe des „RNeasy mini Kit“ (Qiagen) oder mit „PeqGold RNA Pure“ (PeqLab). Die verwendeten *E. coli* und *L. pneumophila* Kulturen wurden auf eine OD₆₆₀ von 0,1 bis 0,2 angeimpft und nach Erreichen einer OD₆₆₀ von 2,0 bis 2,2 für die Isolierung verwendet. Abweichende Zeitpunkte sind im jeweiligen Experiment im Methodenteil angegeben. Es wurde dabei den Angaben des Herstellers folgend vorgegangen.

3.2.3.4 Restriktionsverdau von Nukleinsäuren

Sämtliche verwendete Restriktionsenzyme wurden von der Firma New England Biolabs erworben. Die Restriktionsansätze wurden den Maßgaben des Herstellers entsprechend pipettiert. Die Verdau erfolgte für 1 bis 3 Stunden bei 37°C. Die Ansätze wurden in der Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt, die Elution von Banden aus dem Gel erfolgte mit dem „Wizard SV Gel & PCR *cleanup* System“ (Promega).

3.2.3.5 Ligation von DNA-Fragmenten

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurden zu ligierender Vektor und Insertionsfragment im Verhältnis 1:8 eingesetzt. Ligase (T4 Ligase) und Ligationspuffer wurden bei New England Biolabs erworben und den Herstellerangaben gemäß gehandhabt. *Blunt end* Ligationen wurden bei 16°C über Nacht im Thermocycler durchgeführt, *sticky end* Ligationen für 2h bei 37°C im Brutschrank.

3.2.3.6 Polymerase Kettenreaktion

DNA-Amplifikation mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion erfolgte unter Verwendung des folgenden Standard-Programmes:

Schritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
1	1	5min	95°C
2	30	40s	96°C
3	30	40s	56°C
4	30	2min (1min/kb)	72°C
5	1	7min	72°C

Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 50µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Komponente	Volumen [µl]	Eingesetzte Konzentration
Thermo Pol Puffer	5	10-fach konzentriert
dNTP-Mix	1	10mM jedes dNTP
Primer 1	1	50µM
Primer 2	1	50µM
DNA	1	20-50ng
Taq Polymerase	0,5	5kU/µl
steriles H2O	ad 50	

Nachweis von DNA-Fragmentgrößen mittels Kolonie-PCR:

PCR wurde zur Identifikation mutagenisierter *L. pneumophila* Isolate oder zur Kontrolle transformierter *E. coli* oder *L. pneumophila* Stämme eingesetzt. Dazu wurde von entsprechenden Agarplatten mit einer Pipettenspitze Koloniematerial entnommen und in 100µl ddH₂O suspendiert. Die Suspension wurde anschließend für 10min bei –20°C eingefroren und kurz darauf für 10min bei 95°C gekocht, was zur Lyse der Zellen führte. 2µl des Zelllysats wurden anschließend mit Primern, die das nachzuweisende Fragment flankierten, in die PCR eingesetzt.

3.2.3.7 Reverse Transkriptase-Polymerase Kettenreaktion

Die Amplifikation von isolierter mRNA mit Hilfe der RT-PCR erfolgte im „Thermocycler“ unter Verwendung des folgenden Programms:

Schritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
1	1	30min	50°C
2	1	15min	95°C
3	30	40s	95°C
4	30	40s	56°C
5	30	1min	72°C
6	1	7min	72°C

Material und Methoden

Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 50µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Komponente	Eingesetzte Menge/Konzentration
OneStep RT-PCR Puffer (5×)	10µl
dNTPMix (je 400µM)	2µl
Primer 1&2, (Endkonzentration 0,6µM)	0,7µl
Qiagen One Step RT-PCR Enzyme Mix	2µl
Template RNA (1-3□l)	0,1 bis 2µg RNA
H ₂ O	ad 50µl

3.2.3.8 Inverse PCR

Um Tn5 Insertionsorte in Scattermutanten zu identifizieren wurden Inverse PCRs angesetzt. Dazu wurden zirkularisierte HindIII-Fragmente (siehe 3.2.3.4) den Primern Inv-1 und Inv-2 in die Reaktionen eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 50µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Komponente	Volumen [µl]	Eingesetzte Konzentration
Thermo Pol Puffer	5	10-fach konzentriert
MgCl ₂	1,5	50mM
dNTP-Mix	4	2,5 mM jedes dNTP
Inv-1	1	50pM
Inv-2	1	50pM
Template-DNA	10	20-50ng
Taq Polymerase	0,25	5kU/µl
DMSO	1	100%
steriles H ₂ O	25,25	
Gesamtansatz	50	

Die inversen PCRs erfolgten unter Verwendung des folgenden PCR Programms:

Reaktionsschritt	Zyklen	Zeit	Temperatur
Denaturierung	30	1,5min	95°C
Primer-Anlagerung	30	1min	47°C
Elongation	30	3	72°C

3.2.3.9 Sequenzierungs-Polymerase Kettenreaktion

Die Sequenzierungs-PCR wurden im „Thermocycler“ mit „ABI BigDye 3.1 Terminator Premix“ und Plasmid-DNA durchgeführt. Folgendes Standardprogramm wurde benutzt:

Schritt	Zyklen	Temperatur	Zeit
1	1	96°C	1,5min
2	25	96°C	10s
3	25	56°C	5s
4	25	60°C	4min

Material und Methoden

Die Reaktionsansätze wurden in einem Volumen von 20µl angesetzt und hatten folgende Zusammensetzung:

Komponente	Volumen [µl]	Eingesetzte Konzentration
DNA	1-3	150-300ng
Primer	0,5	10pmol
BigDye	4	1 ×
5 ' Puffer	3	1 ×
H2O	ad20	

Die elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte wurde im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts durchgeführt.

3.2.3.10 Einfügen von Punktmutationen in Plasmid-DNA

Punktmutationen wurden mit dem „QuickChange Site-Directed Mutagenesis Kit“ von Stratagene generiert. Mutageneseprimer (siehe Tab. 3.15) wurden mit dem „QuickChange Primer Design Program“ geplant (www.stratagene.com/qcprimerdesign). Die Anwendung erfolgte nach Herstellerempfehlungen in folgenden Reaktionsansätzen:

Komponente	Eingesetzte Menge/Konzentration
Reaktionspuffer (10×)	5µl
Plasmid DNA	5-50ng
Primer 1	125ng
Primer 2	125ng
dNTP Mix (je 10mM)	1µl
PfuTurbo Polymerase	1µl (2.5U/µl)
H2O	ad 50µl

Folgendes Programm wurde im Thermocycler verwendet:

Segment	Wiederholungen	Temperatur	Zeit
1	1	95°C	30s
		95°C	30s
2	12	55°C	1min
		68°C	1min/kb Plasmidlänge

Im Anschluss wurde der Reaktion 1µl DpnI zugegeben und für 1h bei 37°C inkubiert. DpnI verdaut selektiv die methylierte DNA des Ursprungsplasmids (es wurde in *E. coli* propagiert), welches keine Punktmutation trägt. Nach Fällung der Reaktion wurde diese in 3µl 10% Glycerol (in Wasser) aufgenommen und durch Elektroporation in *E. coli* eingebracht. Je nach verwendetem Plasmid wurde der Transformationsansatz auf selektivem Medium ausplattiert und über Nacht inkubiert. Von gewachsenen Klonen wurde Plasmid-DNA isoliert und durch Sequenzierung der erfolgreiche Basenpaaraustausch überprüft.

3.2.4 Herstellung und Transformation elektrokompenter *E. coli* und *L. pneumophila*

Die Transformation von DNA in elektrokompente *E. coli* bzw. *L. pneumophila* erfolgte durch Elektroporation.

3.2.4.1 Herstellung elektrokompenter *E. coli*.

50ml SOB wurden mit Koloniematerial einer über Nacht auf LB-Agar gewachsenen *E. coli*-Kultur angeimpft und über Nacht unter Schütteln bei 37°C inkubiert. 0,5ml dieser Kultur wurden in 500ml SOB aufgenommen und für 2-3 Stunden unter starkem Schütteln (350rpm) bis zum Erreichen einer OD₅₅₀ von 0,8 inkubiert. Anschließend wurde das gesamte Kulturvolumen für 10min bei 5000×g abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in zwei Waschschritten gewaschen. Dazu wurde das Zellpellet jeweils in 500ml eiskaltem 10% Glycerol (in H₂O) suspendiert und anschließend 20min bei 13000×g abzentrifugiert. Das nach dem letzten Waschschriff erhaltene Zellpellet wurde in 2ml 10% Glycerol WB resuspendiert, zügig in 200µl Aliquots pipettiert und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Zellen erfolgte bei –70°C.

3.2.4.2 Herstellung elektrokompenter *L. pneumophila*

Zur Erzeugung elektrokompenter *L. pneumophila* wurde einer 2 Tage auf BCYE-Agar gewachsenen Kultur mit der Impföse Koloniematerial entnommen und in 1,5ml PBS Puffer suspendiert. Die Suspension wurde abzentrifugiert und das Zellpellet 2 mal mit 1,5ml eiskaltem 10% Glycerol (in H₂O) gewaschen. Das nach dem letzten Waschschriff erhaltene Zellpellet wurde in 40µl 10% Glycerol resuspendiert und in 2 Aliquots geteilt. Die Aliquots wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei –70°C gelagert.

3.2.4.3 Transformation von DNA

E.coli

Die Elektroporation erfolgte im *Cell Porator* unter Zusatz von 1-3µl DNA (0,1-1ng) zu 20µl elektrokompenten Zellen bei 330µF, 4kΩ und 200 DC Volt. Im Anschluss an die Elektroporation wurden die Zellen sofort in 2ml SOC Flüssigmedium aufgenommen und 1 Stunde unter Schütteln bei 37°C inkubiert, um die Expression des transformierten Phänotyps zu ermöglichen. Die Zellen wurden abschließend auf ein selektives Medium ausplattiert und bei 37°C inkubiert. Gewachsene Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des transformierten DNA-Fragments überprüft. Dabei wurden je nach nachzuweisendem Fragment die in der Tabelle unter 2.1.3 angegebenen Primerpaare eingesetzt.

L. pneumophila

Zu 20µl der elektrokompenten Zellen wurden 1-3µl DNA (0,1-1ng) zugesetzt. Der Ansatz wurde 20min auf Eis ruhen gelassen und anschließend bei 330µF, 4kΩ und 400 DC Volt elektroporiert. Die Zellen wurden in 2ml BYE-Flüssigmedium aufgenommen und zur Expression des transformierten Phänotyps für 3 Stunden unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Abschließend wurden die transformierten *L. pneumophila* auf selektivem BCYE-Agar ausplattiert und für 3 bis 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Gewachsene Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des transformierten DNA Fragments überprüft.

3.2.5 Mutagenese von *L. pneumophila*

Zur Mutagenese von *L. pneumophila* wurde die Ausbildung der natürlichen Kompetenz ausgenutzt (72,217). 2ml BYE-Flüssigmedium wurden in sterile 15ml Plastik-Röhrchen gegeben. Dabei wurden je Ansatz 2 Parallelproben pipettiert, um unabhängige Mutanten zu erzeugen. Zusätzlich wurden Steril- und Negativkontrollen (ohne DNA) pipettiert. Die Medien wurden auf eine OD₆₆₀ von 0,2 mit 2 bis 3 Tage altem Kulturmateriel angeimpft. Zusätzlich wurden je Ansatz 5 bis 10µg des Plasmids, welches den *patA knockout* Konstrukt trug (pPA05), zugegeben. Die Kulturen wurden über Nacht (ca. 18h) bei 30°C unter leichtem Schütteln (130rpm) bis zum Erreichen einer OD₆₆₀ von 1,4 bis 1,9 inkubiert und anschließend auf selektivem Medium (BCYE mit Kanamycin) ausplattiert. Gewachsene Klone wurden mittels Kolonie-PCR auf das Vorhandensein des mutagenisierten DNA Fragments und auf Abwesenheit des Wildtyp-Fragments überprüft.

3.2.6 Elektrophoresen und Western Blot

3.2.6.1 Nukleinsäure-Gel-Elektrophorese

Die Nukleinsäure-Gel-Elektrophorese erfolgte mit 0,8 bis 1,2 %igen Agarosegelen und TAE-Puffer. Die Proben wurden mit etwa 0,2 Volumenanteilen Probenpuffer (20% Ficoll 400, 0,07% Bromphenolblau) versetzt und bei 100 bis 160V für ca. 45 Minuten aufgetrennt. Die Färbung der Nukleinsäurebanden erfolgte für 30 Minuten im Ethidiumbromid-Bad (2µg/ml EtBr in TAE). Die gefärbten, aufgetrennten Nukleinsäuren wurden im UV-Transilluminator bei 254nm begutachtet. Die Dokumentation erfolgte mit dem angeschlossenen Videosystem, PC und Fotodrucker.

Bei präparativen Gelen wurden die Banden mit dem Skalpell ausgeschnitten und unter Verwendung des „Qiaquick Gel extraction Kit“ eluiert.

3.2.6.2 SDS-PAGE

Für die SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese wurden 10%ige SDS-PAGE verwendet. Die Proben wurden 1+3 mit reduzierendem Roti-Load-Proteinauftragspuffer versetzt und 90s im Wasserbad gekocht. Die Elektrophorese wurde in SDS-Laufpuffer bei 200V, ca. 110mA ca. 35 Minuten bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Anfärbung der Proteine erfolgte durch Coomassiefärbung (über Nacht in 1×Coomassie-Färbelösung incl. 20% Methanol unter Schwenken) oder Silberfärbung mit dem „Silver Staining Kit“ für Protein nach den Vorgaben des Herstellers (Amersham).

3.2.6.3 Western Blot

Nach „Aktivierung“ der PVDF Membran durch 100% Methanol (1min) wurden die SDS-PAGE Gele und die PVDF Transfermembran für 10min in Transferpuffer äquilibriert. Anschliessend wurden 8 Lagen Whatman Papier auf Gelgrösse zugeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer getränkt. Anodenseitig wurden 4 Lagen Whatman Papier in den *semidry*-Blotter gelegt, darauf wurde die äquilibrierte PVDF Membran, dann das SDS-PAGE Gel und schliesslich weitere 4 Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman Papier gelegt. Nach Auflegen der Kathode wurde der Western Blot mit 0,8mA/cm² Gel für 45min gefahren.

3.2.6.4 Immundetektion geblotteter Proteine

Die PVDF Membran wurde für eine Stunde in PBS-T mit 5% Milchpulver geblockt. Nach einmaligem Waschen wurden anschliessend die Primärantikörperlösungen zugegeben und 1h unter Schwenken bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 mal 5min Waschschritten in PBS-T wurden die Sekundärantikörperlösungen, die HRP (*horseradish peroxidase*) konjugierte Antikörper enthielten für eine Stunde unter Schwenken inkubiert. Die Antikörper wurden jeweils in PBS-T verdünnt. Nach 3 abschliessenden Waschschritten (je 5min) in PBS-T wurde die Immunreaktion mit dem „ECL Western Reagents Kit“ (Amersham) nach Herstellerangaben detektiert.

Spezifität/Bezeichnung	Spender	Kat.Nr.	Hersteller	Einges. Verd.(v/v)
Primäre Antikörper				
anti-GAPDH cl. 71-1monoklonal	mouse	G8795	Sigma-Aldrich	1:1000
anti-PatA Klon85/7 monoklonal	Maus	generiert in dieser Arbeit		1:2000
anti GFP cl. GSN-24 monoklonal	Maus	G6795	Sigma-Aldrich	1:3000
anti-PatA H39	Hühnchen	generiert in dieser Arbeit		1:2000
Sekundäre Antikörper				
anti Chicken IgY-HRP	Kaninchen	A9792	Sigma	1:3000
anti-Mouse-HRP	Goat	A9044	Sigma-Aldrich	1:3000

3.2.7 Expression und Aufreinigung von Proteinen

3.2.7.1 Proteinexpression und Zellaufschluss

Die mit IPTG induzierten *E. coli* BL21 Expressionskulturen (siehe 2.2.1.2) (in der Regel 500ml Kulturvolumen) wurden nach 4 bis 6-stündiger Schüttelinkubation pelletiert und ggf. bei -80°C eingefroren und gelagert. Für die Zelllyse wurden die Pellets in 10ml Proteinbindepuffer suspendiert und für 30min mit Lyozym (1mg/ml final) und Benzonase (1 Messerspitze) auf Eis inkubiert. Anschliessend wurden die Proben 5×15s mit der Ultraschallspitze (90%) aufgeschlossen. Die Proben wurden anschliessend mit Protein-Bindepuffer auf 50ml Volumen eingestellt und 30min bei 13.000×g (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand welcher die löslichen Proteine enthielt wurde anschliessend abgenommen und der FPLC unterzogen.

3.2.7.2 Aufreinigung von His₆ markierten Proteinen

Die Aufreinigung der mit Hexahistidin Tags markierten Proteine erfolgte über HisTrap HP Säulchen (1ml bzw. 5ml) von Amersham. Die zentrifugierten bakteriellen Zelllysate der Expressionskultur (500ml Kulturvolumen) wurden mit 5ml/min auf die nach Herstellerangaben äquilibrierte Säule gegeben und anschliessend mit einem Imidazolgradienten (10%, 20%, 30%, 40%, 80%, 100% von 500mM Imidazol) eluiert. Die eluierten Fraktionen wurden anschliessend mittels SDS PAGE untersucht und der Proteingehalt wurde mit der Roti Nanoquant Fertiglösung bestimmt. Die Fraktionen welche die gesuchte Proteinbande enthielten wurden ggf. kombiniert und über Nacht bei 4°C in PBS dialysiert. Am Folgetag wurde erneut der Proteingehalt bestimmt und die proteinhaltige Lösung direkt verwendet (ggf. mit 1×Protease-Inhibitor Mix FY, Serva) oder versetzt mit 10% Glyzerol bei -80°C eingelagert.

3.2.8 Nachweis von PLA

3.2.8.1 Gewinnung von bakteriellen Zellpelletlysaten und Kulturüberständen

Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte in den angezogenen Flüssigkulturen wurde 1ml Kulturvolumen entnommen und bei 5000×g 5min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände von den Zellpellets getrennt. Die Kulturüberstände wurden mit 3mM (final) Natriumazid (NaN₃) versetzt und bei 4°C für maximal 48 Stunden gelagert. Die Zellpellets wurden nach Zugabe von 0,1 % Triton X-100 und 50µl Lysozym (10mg/ml) 30 min bei 37°C lysiert. Anschließend wurden die lysierten Zellpellets mit einer 26-G Kanüle

homogenisiert und mit 40mM Tris-HCl auf das Ausgangsvolumen (1ml) aufgefüllt. Die Lysate wurden bei 4°C für maximal 48 Stunden gelagert.

3.2.8.2 Gewinnung von A549 und U937 Zelllysaten

5×10^6 adhärenzte A549 bzw. U937 Zellen wurden mit Trypsin/EDTA (A549) oder PBS+0,2%EDTA (U937) von der Kulturschale abgelöst und mit PBS gewaschen. EDTA ist in als Chelatbildner in der Lage dem Kulturmedium Ca^{2+} zu entziehen welches für die Ausbildung von Zellkontakten notwendig ist. Entzug des extrazellulären Ca^{2+} führt zur Ablösung von Zellen, so dass suspendierte Einzelzellen gewonnen werden können. Der Einsatz der Protease Trypsin bewirkt durch Verdau von Zelladhäsionsmolekülen ebenfalls ein Ablösen der Zellen vom Kulturschalenboden bzw. voneinander. Nach dem Waschschrift wurden die Zellen in 1ml steriles H_2O bidest aufgenommen (osmotischer Schock), mit $1 \times$ Protease-Inhibitor Mix FY (Serva) versetzt und zur Lyse 10mal durch eine 26-G Kanüle gezogen. Anschliessend wurden die Zellen über Nacht bei -80°C eingefroren, am Folgetag auf Eis aufgetaut und zur vollständigen Lyse $5 \times 15\text{s}$ mit der Ultraschallspitze behandelt. Die Lysate wurden dann 15min bei $13.000 \times g$ (4°C) zentrifugiert und die Überstände (ca. 1ml) mit 3,5ml kaltem H_2O bidest und 0,5ml $10 \times \text{PBS}$ auf 5ml Gesamtvolumen eingestellt. Die Lagerung der Lysate erfolgte bei -80°C.

3.2.8.3 Verdau von Lipidsubstraten

Zum hydrolytischen Verdau wurden verschiedene Phospholipide und ein apolares Lipid eingesetzt (Tab. 3.4).

Die Reaktionen erfolgten unter folgenden Bedingungen:

Die Substrate wurden in einer Konzentration von 13,4 mM unter Zusatz von 6mM NaN_3 , 1% Triton X-100 und 40mM Tris-HCl (pH 7,5, 25°C) angesetzt. Bei Reaktionen in sauren oder alkalischen Verhältnissen wurde anstelle Tris-HCl (pH 7,5) NaAcetat (40mM, pH 4,0) bzw. CHES Puffer (40mM, pH 9,0) verwendet. Die Substrate wurden für 15min bei 37°C stark geschüttelt und anschließend mit Ultraschall beschallt. Die Beschallung erfolgte jeweils in 3 Intervallen von 15s Dauer bei einer Intensität von 65%. Durch die Beschallung wird die Formation von kleineren Phospholipid-Mizellen oder -Vesikeln gefördert.

Anschließend wurden die Substrate in Mikrotiterplatten im Verhältnis 1:1 mit den Kulturüberständen, Zellpelletlysaten oder aufgereinigtem Protein (Konzentration ist im jeweiligen Experiment im Ergebnisteil angegeben) gemischt und unter Schütteln (ca. 100rpm) bei 37°C für 2 bis 26 Stunden inkubiert (Angaben im Ergebnisteil). Die Lysate aus *L. pneumophila* wurden 1:10 in 40mM Tris-HCl verdünnt in die Reaktionen eingesetzt, da die starken zellgebundenen PLA-Aktivitäten andernfalls bereits nach kurzer Inkubationsdauer

Material und Methoden

Phospholipide bis über die Sättigungsgrenze der Messbarkeit verdaut hätten. Geringere Aktivitätsunterschiede wären so in kürzester Zeit überdeckt und nicht mehr messbar gewesen. Als Negativkontrolle diente bei der Inkubation von Kulturüberständen BYE-Bouillon (*L. pneumophila*) bzw. LB-Bouillon (*E. coli*). Bei Inkubation der Pelletlysate diente 40mM Tris-HCl als Kontrolle. Bei Inkubation von gereinigtem Protein, das in PBS gelöst war, diente PBS als Pufferkontrolle.

Bei Experimenten, in denen getestet wurde ob die Aktivität von aufgereinigtem PatA Protein durch Zugabe von bakteriellen- oder eukaryontischen Zelllysaten veränderbar/aktivierbar ist, wurde der Proteinklösung (Konzentrationen sind im jeweiligen Experiment angegeben) vor Beginn der Inkubationsperiode 7,5% (v/v) oder 0,75% (v/v) Zelllysate (siehe 3.2.8.1/2) zugegeben. Als Kontrollen wurde PBS Puffer im gleichen Volumen mit Lysaten versetzt. Nach Zugabe der Substratlösungen im Verhältnis 1:1 ergaben sich Endkonzentrationen von 3,75 oder 0,375% Lysat im Gesamtreaktionsansatz.

3.2.8.4 Messung der freien Fettsäuren

Der Nachweis freigesetzter Fettsäuren mit dem Nefa-C-Test Kit folgt folgendem Prinzip:

Die durch hydrolytische Spaltung der Esterbindungen zwischen Fettsäuren und Glycerol-Rückgrat der Lipidsubstrate freigewordenen Fettsäuren werden in einer endergonen Reaktion unter Beteiligung des in Farbreagenz A enthaltenen Enzyms Azy-CoA-Synthetase an das Coenzym A (CoA) gebunden. Das azylierte CoA wird anschließend durch die Azy-CoA Oxidase oxidiert, wobei Protonen abgespalten werden, die sich mit Sauerstoffmolekülen zu Wasserstoffperoxid verbinden. Wasserstoffperoxid stellt ein starkes Oxidationsmittel dar und oxidiert den in Farbreagenz A enthaltenden Farbstoff 4-Aminophenazon zu einem Chinonimin Farbstoff. 4-Aminophenazon besitzt ein Absorptionsmaximum im Bereich des ultravioletten Lichts. Durch die Oxidation in den Chinonimin Farbstoff verschiebt sich das Absorptionsmaximum in den sichtbaren Bereich bei 550nm. Es vollzieht sich also bei vorhandenen freien Fettsäuren durch die Generierung von Wasserstoffperoxid ein Farbumschlag, dessen Intensität bei 550nm messbar ist. Anhand dessen kann mit Hilfe einer Standardreihe auf den Gehalt freigesetzter Fettsäuren geschlossen werden.

Die Detektion freier Fettsäuren aus dem Lipid-Probe-Reaktionsansatz erfolgte mit dem Nefa-C-Test Kit. Hierbei wurden 10µl des Inkubats unter 15 Minuten Schüttelinkubation bei Raumtemperatur mit 50µl Farbreagenz A, und anschließend weitere 15 Minuten mit 100µl Farbreagenz B unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Der bei Vorhandensein freier Fettsäuren erfolgende Farbumschlag wurde visuell begutachtet und im Mikrotiterplattenreader durch Bestimmung der OD₅₅₀ gemessen. Die Konzentration der freien Fettsäuren wurde auf Basis einer Standardkurve errechnet, die mittels des im Kit mitgelieferten Ölsäurestandards generiert wurde.

Material und Methoden

Farbreagenz A enthält: 0,3kU/l Acyl-CoA-Synthetase, 3kU/l Ascorbat-Oxidase, 0,6g/l Coenzym A, 5mM Adenosintriphosphat, 1,5mM 4-Aminophenazon, 50mM Phosphat-Puffer (pH 6,9), 3mM MgCl₂, 0,2% Triton X-100.

Farbreagenz B enthält: 6,6kU/l Acyl-CoA Oxidase, 7,5 kU/l Peroxidase, 0,2g/l 3-Methyl-N-ethyl-N-(β-hydroxyethyl)anilin, 10mM Maleimid.

3.2.8.5 Lipidextraktion und Dünnschichtchromatografie

Um verschiedene Lipidspezies zu detektieren wurden aus den Lipidhydrolysereaktionen Lipide nach der Methode von Bligh *and* Dyer (22) extrahiert. 100µl der Reaktion wurden mit 400µl Methanol und 200µl Chloroform für 30min bei 37°C inkubiert. Anschliessend wurden 280µl H₂O bidest sowie 200µl Chloroform zugegeben und für eine gründliche Durchmischung der Phasen 10min bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Danach wurde zur Phasentrennung 2min bei 2.000×g zentrifugiert. Nach Verwerfen der wässrigen Phase wurde die Chloroformphase, die die Lipide enthielt, evaporiert. Die getrockneten Lipide wurden anschliessend in 30µl Chloroform/Methanol (2:1 v/v) aufgenommen und auf Kieselgelplatten aufgetragen. Zur Detektion unpolarer Lipide (z.B. Glyzerolipide, Fettsäuren) wurden die beladenen Kieselgelplatten in einen Glastank gestellt, die ein apolares Laufmittel, bestehend aus n-Hexan, Diethyl-Ether und Essigsäure [70:30:4 (v/v/v)] und für 30 bis 60 Minuten verschlossen inkubiert. Um polare Lipide (Lysophospholipide, Phospholipide) zu trennen wurde ein polares Laufmittel, bestehend aus einem Chloroform, Methanol, Wasser- Gemisch [65:25:4 (v/v/v)], verwendet. Zur Detektion der Lipide wurden die Kieselgelplatten kurz in Wasser gewaschen, anschliessend für 10min mit 0,2% Naphtol Blau-Schwarz in 1M NaCl inkubiert und schliesslich mit 1M NaCl gewaschen (170).

3.2.8.6 Hämolyseassays

500µl humanes Blut wurden mit 40ml PBS versetzt und durchmischt. Die zu testenden *Legionella*-Stämme wurden für einen Tag auf BCYE Agarplatten angezogen. Anschliessend wurde eine Flüssigkultur angeimpft und bis zum Erreichen einer Kulturdichte von OD₆₆₀ 2,0 inkubiert (siehe 2.2.1). 1ml der Kultur wurden dann pelletiert und in PBS auf OD₆₀₀ 1,0 eingestellt. 400µl der eingestellten Bakterien wurden schliesslich mit 1600µl der Blutsuspension versetzt und vor einer Inkubation über 20h bei 37°C für 2min bei 800×g zentrifugiert. Als Lysekontrolle wurde anstelle der Bakterien 400µl Ethanol (100%) eingesetzt, als Negativkontrolle diente PBS ohne Bakterien.

Die Hämolyse durch die untersuchten *Legionella* Stämme wurde durch Messen der OD₄₁₅ (Absorptionsmaximum von Hämoglobin) verglichen (73).

3.2.9 Zytotoxizitätstest von PatA, Vitalitätsbestimmung von U937 Makrophagen

Die Vitalitätsbestimmung von U937 Makrophagen nach Zugabe von PatA bzw. PatAS73A erfolgte mit dem Farbstoff Alamar Blue. Alamar Blue ermöglicht eine Bewertung des Zustands der metabolischen Aktivität eukaryontischer Zellen. Molekulare Marker vitaler eukaryontischer Zellen mit intaktem Zellstoffwechsel wie NADPH oder FADH sind in der Lage, Alamar Blue zu reduzieren. Die Reduktion des Farbstoffs manifestiert sich in einem Farbumschlag von nicht-fluoreszierendem Blau (Absorption 600nm) (der Farbstoff liegt in oxidierte Form vor) hin zu einer fluoreszierenden violetten Erscheinung (Emission 590nm, Absorption 570nm). Die Alamar Blue Methode gestattet daher, anhand der Entwicklung des Farbstoffs entweder über durch Messung der emittierten Fluoreszenz oder durch Absorptionsmessung der zu untersuchenden Reaktionsansätze die Vitalität der Makrophagen zu vergleichen. Alle Schritte des Experiments fanden bei 37°C und 5% CO₂ im Zellkulturschrank statt. 10⁶, 10⁵, und 10⁴ U937 Makrophagen pro well wurden in 96-well Platten adhärirt (100µl Volumen in RPMI +10%FKS). Als Referenz-wells dienten Kavitäten in denen sich keine Zellen befanden. Anschliessend wurde das Medium entfernt und durch 100µl PatA bzw. PatA S73A (10 bzw. 5µg/100µl) haltiges, sterilfiltriertes RPMI ersetzt. Nach 2,5h Inkubation bei 37°C und 5%CO₂ wurde der Alamar Blue Farbstoff in einem Verhältnis von 10+1 zugesetzt (10µl Farbstoff auf 100µl Kulturvolumen). Nach 1h Inkubation wurde die Absorption des Farbstoffs bei 570nm und 600nm gemessen und die zu den Referenz-wells relative Reduktion des Alamar Blue Farbstoffs nach Herstellerangaben kalkuliert.

3.2.10 Intrazelluläre Infektion von *A. castellanii*, U937 Makrophagen und A549 Epithelzellen

3.2.10.1 Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit von *L. pneumophila* in *A. castellanii*

Die 3 Tage im CO₂-Inkubator bei 37°C angezogenen *A. castellanii* (ATCC 30234) wurden auf eine Zelldichte von 1×10⁵ Zellen je ml eingestellt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte nach Anfärbung mit Trypanblau in einer Neubauer Zählkammer der Firma Roth. Die 2 Tage bei 37°C auf BCYEα-Agar inkubierten *L. pneumophila* wurden mit einer sterilen Impföse in PBS überführt und auf eine OD₆₆₀ von 0,3 (ca. 1×10⁹ Zellen je ml) eingestellt. Diese Zelldichte wurde anschließend 1:10000 auf 1×10⁵ je ml verdünnt. In die wells von 24 well-Mikrotiterplatten wurden in jeweils 12 Wiederholungen 1×10⁵ *A. castellanii* Amöben (in 1ml) und 1×10⁵ *L. pneumophila* (in 1ml) pipettiert und für 72 Stunden im CO₂-Inkubator inkubiert. Zu Beginn der Ko-Infektion, nach 24 Stunden, 48 und 72 Stunden wurden jeweils drei Parallelansätzen 1ml Probe entnommen und zur Ermittlung der Bakterienzahl ausplattiert. Zusätzlich wurden Aliquots der einzelnen Bakterien-Inokkula vor Einsatz in die Ko-Kultur

Material und Methoden

nach entsprechender Verdünnung ausplattiert. Die Ausplattierung erfolgte unter Verwendung des „Whitley Spiral Plater“. Durch Zählung der CFU in den ausplattierten Proben konnte retrospektive die Entwicklung der Zellzahlen jedes getesteten Klons konstruiert werden, die über die intrazelluläre Vermehrungsfähigkeit der Klone Auskunft gab.

3.2.10.2 Test der intrazellulären Vermehrungsfähigkeit in U937 und A549 Zellen

A549 Zellen, eine humane Lungenkarzinom-Epithelzelllinie, und U937 Zellen (ATCC CRL-1593.2), eine humane Monozyten Zelllinie, die nach Behandlung mit Phorbol Ester (80 nM Phorbol-12-Mystrate-13-Azetat, P-8139, Sigma-Aldrich) in Makrophagen-ähnliche Zellen differenziert, wurden als weitere Wirtszellmodelle für die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* verwendet. Für Ko-Infektionsassays wurden die Kavitäten von 24-well Platten mit 10^6 A549 (in RPMI+10%FKS) oder ausdifferenzierten U937 Zellen (in RPMI) befüllt und zur Adhärenz der Zellen für 2 bis 3h im Zellkulturschrank inkubiert. Die Zellzählung erfolgte in Neubauer Zählkammern. Wildtyp *L. pneumophila* oder isogene Mutanten (Insertion von Tn5 bei Scatterklonen oder KnR Resistenzkassette bei gerichtet mutagenisierten *patA* Mutanten) wurden mit einer MOI (*multiplicity of infection*=Zahl der Bakterien/Zahl der Wirtszellen) von 0.1 (U937) bzw. 1.0 (A549) in die Ko-Infektionen eingesetzt. Die Zellen wurden dann für 2h mit den Bakterien inkubiert und anschliessend 3-mal mit RPMI+10%FKS gewaschen um nicht-adhärenzierte Bakterien zu entfernen. Anschliessend wurden die wells mit 1ml RPMI+10%FKS befüllt und für 72 bis 96h inkubiert (37°C, 5%CO₂). In 24h Intervallen (incl. 0h Wert) wurden jeweils 2 oder 3 wells 10µl 10% Saponin zugegeben um die Wirtszellen zu lysieren. Die Saponin-haltigen Ansätze wurden dazu 10min im Brutschrank inkubiert und danach zur vollständigen Zelllyse 8×Auf- und Ab-Pipettiert. Die bakterienhaltigen Lysate wurden mit dem „Whitley Spiral Plater“ zur Ermittlung der CFU/ml Infektionsansatz auf BCYE Agar ausplattiert.

3.2.10.3 Bakterienzahlbestimmung mit dem „Whitley Spiral Plater“

Mit Hilfe des „Whitley Spiral Plater“ wurden nach entsprechender Verdünnung mit Kulturmedium jeweils 50µl der jeweiligen *L. pneumophila*-Bakteriensuspension in logarithmisch abnehmender Menge spiralförmig auf eine Agarpalatte appliziert. Nach 3 Tagen Inkubation im Brutschrank konnte die Anzahl gewachsener Kolonien mit dem Koloniezählgerät ermittelt werden und so die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in der Bakteriensuspension bestimmt werden.

3.2.11 Herstellung und Präadsorption von Antikörpern

3.2.11.1 Herstellung monoklonaler PatA spezifischer Antikörper

Immunisierung: Zur Herstellung monoklonaler, *patA* spezifischer Antikörper wurde eine BALB/c Maus innerhalb von 14 Tagen 5mal mit 60µg rekombinant aufgereinigtem PatA (in 100µl PBS) immunisiert. Die erste Immunisierung erfolgte mit Freund's Adjuvans *complete* (100µl PatA + 100µl Adjuvanz), die zweite erfolgte mit Freund's Adjuvans *incomplete* und die folgenden drei erfolgten ohne Adjuvanz. Eine Primärtestung von Milzzellüberstand (Gewinnung des Überstands: siehe Zellfusion) fand an Tag 15 nach der ersten Immunisierung statt und bestätigte eine gute Immunantwort.

Zellfusion: Am Tag 15 wurde die Milz der Maus entfernt, in RPMI-1640 gewaschen, suspendiert und 1:10 (v/v) mit 3% Essigsäure versetzt (Abtöten der Blutzellen). Anschliessend wurden die gereinigten Milzzellen (der Milzzellüberstand ging in die Primärtestung ein) im Verhältnis 1:2,5 mit X63 Myelomzellen (Suspensionszellen) versetzt und für 10min bei 900rpm zentrifugiert. Nach gründlichem Abnehmen des Überstands wurde unter Schütteln im 37° Wasserbad in definierten Zeitabständen folgendes zugegeben: Innerhalb 1min 1ml PEG 4000 (Polyethylenglycol), 1min Pause, 1ml RPMI (in 30s), 2ml RPMI (in 20s), 1ml RPMI (10s), 16ml RPMI (in 60s). Es folgte ein Zentrifugationsschritt für 7min bei 700rpm, gefolgt von 5min Ruhephase bei 37°C. Nach Abnehmen des Überstands wurden 250ml temperiertes RPMI Medium mit 15% FKS, 50mM β-Mercaptoethanol, Streptomycin/Penicillin Mix zugegeben und vorsichtig suspendiert. Anschliessend wurde 5ml HAT Medium zugegeben (Selektionsmedium, nur Hybridome überleben).

Selektion: Die Zellen wurden in einer Dichte von 10⁵ Zellen/*well* in die Kavitäten von 10 24-*well* Platten überführt und kultiviert. Durch mikroskopische Begutachtung der Platten wurden 33wells selektiert die Hybridome enthielten. Diese wurden selektiert und in mehreren Vereinzlungsschritten passagiert. Durch Western Blot Testungen und Vereinzlungsschritte wurden schliesslich 2 Klone identifiziert die Antikörper produzierten welche spezifisch mit PatA reaktiv waren, was sich durch eine einzelne Bande im Westernblot zeigte. Hybridomaüberstände dieser Klone wurden bei -80°C gelagert, die Klone wurden in flüssigen Stickstoff eingelagert. Die Herstellung der monoklonalen Antikörper erfolgte in Kooperation mit Dr. J. Helbig, TU Dresden.

3.2.11.2 Herstellung polyklonale Eidotterantikörper

Zur Generierung polyklonaler, PatA spezifischer, IgY Eidotterantikörper wurden zwei SPF Hennen subkutan oder intramuskulär 3-malig mit dem rekombinant aufgereinigten (sterilen) Antigen (100µg/100µl PatA+100µl Freund's Adjuvans) immunisiert. Nach der Basisimmunisierung an Tag 0 (Freund's Adjuvans *complete*) erfolgte die erste Boosterung an

Tag 28, die zweite an Tag 38 (beides mit Freund's Adjuvans *incomplete*). An Tag 56 wurde mit der Antikörpergewinnung begonnen. Die gelegten Eier wurden **kühl** gelagert aufbewahrt und regelmäßig-nicht älter als vier Wochen-eingeschlagen und als Eidotterhomogenisat mit 1 : 1 PBS-Pufferlösung unter keimarmen Bedingungen verarbeitet. Die Herstellung der polyklonalen Antikörper erfolgte in Kooperation mit Prof. Dr. R. Schade, HU Berlin.

3.2.11.3 Präadsorption polyklonaler Antikörper

Vor Gebrauch der in dieser Studie generierten polyklonalen PatA spezifischen Hühnchen Antikörper wurden diese gegen Bakterien- und Wirtszelllysate präadsorbiert um unspezifische Bindungen zu minimieren. Dazu wurden Lysate der *L. pneumophila patA* Mutante oder von A549 Epithelzellen hergestellt (siehe 3.2.8) und für 1h bei Raumtemperatur mit einer aktivierten PVDF Membran inkubiert. Anschliessend wurde die PVDF Membran mit 5% Milchpulver in PBS-T Puffer vollständig abgeblockt und gewaschen. Die Antikörper wurden daraufhin 1:100 (v/v) in PBS verdünnt und für eine Stunde mit der Membran inkubiert. Die präadsorbierte Antikörperlösung wurde schliesslich abgenommen und mit 5% FKS versetzt bei -20°C gelagert.

3.2.12 Transfektion von A549 Zellen

A549 Zellen wurden in 24-*well* Platten eingesäht (10^5 Zellen je well in 0,5ml RPMI/FKS), in die vorher sterile 12mm Deckgläschen eingelegt worden waren, und für 2 bis 3h bei 37°C und 5%CO₂ adhäriert. Danach wurde das Medium erneuert (wieder 0,5ml RPMI/FKS) und die Transfektionsreagenzien zugegeben. Diese wurden pro zu transfizierendem *well* wie folgt angesetzt: 0,75µg Plasmid DNA wurden mit 30µl RPMI (ohne FKS) versetzt und anschliessend zu einer Lösung aus 20µl RPMI (ohne FKS) und 3µl Metafectene gegeben. Dieser Ansatz (ca. 55µl) wurde ohne zu mischen für 20min bei Raumtemperatur inkubiert und daraufhin vorsichtig zu den Zellen gegeben. Die Transfektionsansätze wurden dann für sechs bis acht Stunden im Zellkultur-Brutschrank inkubiert. Nach einem weiteren Mediumwechsel (RPMI/FKS) erfolgte eine weitere Inkubation über Nacht für 14 bis 18 Stunden. Die Zellen wurden daraufhin fixiert und der weiteren Verwendung zugeführt.

3.2.13 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.2.13.1 Fixierung von Zellen und Bakterien

Auf Deckgläschen transfizierte oder infizierte Zellen wurden 3mal mit PBS Puffer (Raumtemperatur) gewaschen. Anschliessend wurden in die Kammern der 24-*well* Platten

Material und Methoden

250µl 3% Paraformaldehyd (in PBS) gegeben und die Zellen für 30 bis 60 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Zur Lagerung der fixierten Zellen wurden in die *wells* 750µl PBS gegeben (1:4 Verdünnung der Fixans), die Platten mit Parafilm versiegelt und bei 4°C unter Lichtausschluss aufbewahrt.

Bakterien wurden in Flüssigkulturen angezogen und nach Pelletieren sowie zwei Waschschritten (PBS Puffer) in Suspension mit 250µl 3% Paraformaldehyd für 30 bis 60 Minuten in 2ml Reaktionsgefäßen fixiert. Zur Lagerung der fixierten Zellen wurden 750µl PBS zugegeben (1:4 Verdünnung der Fixans) und die Reaktionsgefäße im Kühlschrank (4°C) verwahrt. Für die mikroskopische Betrachtung oder Immunfärbung wurden die fixierten Bakterien in entsprechenden Verdünnungen auf Poly-L-Lysin beschichteten Diagnostika-Objektträgern durch Antrocknen fixiert und anschliessend mit H₂O bidest gewaschen.

3.2.13.2 Immunfärbung von Präparaten

Auf Deckgläschen transfizierte und fixierte Zellen, die GFP Fusionsproteine exprimierten, wurden, wenn keine weitere Immunfärbung erfolgte 3mal mit PBS gewaschen und auf Objektträgern mit „ProLong Gold Antifade“ mit oder ohne DAPI (Invitrogen) *gemounted*.

Zur Immunfärbung fixierter, auf Deckgläschen transfizierter oder infizierter Zellen wurden diese nach 3-maligem Waschen in PBS Puffer weiter verarbeitet. Sämtliche Schritte erfolgten bei Raumtemperatur, Inkubationsschritte wurden in der feuchten Kammer durchgeführt. Zum Permeabilisieren und Blocken der Zellen wurden die Deckgläschen auf Parafilm für 1h bei Raumtemperatur in 30µl Permeabilisierungs/Blocklösung inkubiert (0,1% Saponin, 5% Ziegenerum in PBS+50mM NH₄Cl). Nach einem Waschschriff (Waschpuffer 0,1% Saponin in PBS) erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper für 1h. Antikörper wurden in Waschpuffer+5% FKS verdünnt und appliziert. Nach 5-maligem Waschen durch mehrfaches Eintauchen in Waschpuffer wurden Sekundärantikörper, verdünnt in Waschpuffer+5% FKS eingesetzt und für 1h inkubiert. Nach abschliessendem 5-maligen Waschen in Waschpuffer und 3-maligem Waschen in PBS ohne Saponin wurden die Präparate mit „ProLong Gold Antifade“ mit oder ohne DAPI (Invitrogen) *gemounted*. Die Objekte wurden für 24h unter Lichtausschluss bei Raumtemperatur getrocknet und schliesslich mikroskopisch begutachtet.

3.2.13.3 NileRed Färbung intrazellulärer Lipideinschlüsse

Die auf Poly-L-Lysin beschichteten Objektträgern fixierten Bakterien wurden gründlich in Wasser gewaschen. Eine 25mM NileRed Vorratslösung (in DMSO) wurde 1:500 (v/v) in H₂O bidest verdünnt. Anschliessend wurden die Objektträger für 30min in der verdünnten NileRed Lösung bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer inkubiert. Nach 3-maligem Waschen für 10min in H₂O wurden die Objektträger getrocknet und mit „ProLong Gold

Antifade“ (Invitrogen) *gemounted*. Die fluorszenzmikroskopische Begutachtung erfolgte mit dem FITC Filter. (NileRed: Exzitation 450-500nm, Emission >528nm)

3.2.14 Elektronenmikroskopie

Zur Rasterelektronenmikroskopischen (REM) Begutachtung der *L. pneumophila* Scatterkolonien wurden die mit Kolonien bewachsenen Agarplatten mit Fixans [10% Glutaraldehyd (GA) in 0,05M Hepes] überschichtet und 1h bei Raumtemperatur gelagert. Vor der Aufbereitung für das REM wurden die fixierten Platten 4 Tage im Kühlschrank gelagert. Geeignete, d.h. am Agar fest haftende Kolonien wurden mit dem Skalpell ausgeschnitten und in 2,5% GA in 0,05M Hepes überführt. Nach 3-maligem Waschen mit PBS wurden die Proben anschliessend über eine aufsteigende Alkoholreihe entwässert (15%, 30%, 50%, 70%, 90%, 96% EtOH; jeweils 15 min) abschliessend 2 mal 30min in 100% EtOH inkubiert. Danach erfolgte die Trocknung am kritischen Punkt aus CO₂ (Balzers CPD 030). Hierbei wird zur Vermeidung von Oberflächenspannungen, die für die Strukturhaltung der Präparate kritisch sind, der Alkohol zunächst durch flüssiges CO₂ substituiert. Anschliessend erfolgt durch Absenkung des Kammerdrucks bei konstanter Temperatur die Trocknung. Dabei geht das flüssige CO₂ beim Unterschreiten seines kritischen Druckes spontan in den gasförmigen Zustand über, wodurch die Probe trocknet. Die trockenen Präparate wurden mit Gold-Palladium Partikeln (3nm) beschichtet ("sputtern") und schliesslich im REM (Leo 1530, Zeiss) bei einer Hochspannung von 3kV mit dem *in-lens* Sekundärelektronen-Detektor mikroskopiert. Die Präparationsschritte ab der Dehydratisierung der Proben incl. der Mikroskopie wurden im elektronenmikroskopischen Servicezentrum des Robert Koch-Instituts durchgeführt (Frau Holland, Dr. Bannert).

3.2.15 Scatterscreen

3.2.15.1 Transposon Mutagenese

Um die erforderliche Anzahl von *L. pneumophila* Transposon Insertionsmutanten zu generieren wurden 3 Mutagenesen durchgeführt bei denen insgesamt 11.300 Insertionsmutanten erzeugt wurden. Dazu wurden 20µl elektrokompente *L. pneumophila* Philadelphia-1 mit 1,5µl EZ-Tn5 Transposom-Komplexen für 30min auf Eis inkubiert und anschließend elektroporiert (siehe 3.2.3.10). Die elektroporierten Zellen wurden in 2 ml BYE Flüssigmedium aufgenommen und 4 h bei 37°C unter Schütteln (350-400 rpm) inkubiert. Anschliessend wurden die Zellen in Aliquots von je 65 µl auf BCYE Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert und für 3 Tage bei 37°C inkubiert. Bei einem Teil der Platten wurde exemplarisch die CFU ermittelt um die Zahl der erhaltenen Klone überschlagen zu können.

Material und Methoden

Die Kolonien wurden dann mit einem sterilen Wattetupfer in BYE Flüssigmedium mit einem Endvolumen von 40 ml von den Platten abgewaschen. Von dieser Klonmischung wurden dann 30×100µl auf BCYE Platten mit Kanamycin ausplattiert und nach 3 Tagen bei 37°C wurden diese noch einmal mit BYE Flüssigmedium abgewaschen und die Mischung als Glyzeringefrierkulturen eingefroren.

3.2.15.2 Identifizierung der Transposon-Insertionsorte

Die genaue chromosomale Lokalisation der Transposoninsertionen wurde nach dem in Abb. 3.1 gezeigten Schema durchgeführt. Dazu dienten „inverse PCR“ (164), die mit auf dem Transposon lokalisierten, und dort nach „ausen“ gerichteten Primer-Bindestellen durchgeführt wurden (KAN-2 FP-1 und KAN-2 RP-1 bzw. Inv-1 und Inv-2). Zunächst wurde von der Mutante von Interesse genomische DNA isoliert (siehe 3.2.3.2) und anschliessend mit dem Restriktionsenzym HindIII über Nacht bei 37°C verdaut. Nach 12 h wurde der Restriktionsverdau inaktiviert (20min 65°C) und über Nacht mit T4 Ligase zirkularisiert. Nach Fällung der zirkularisierten DNA wurden Inverse PCRs mit den Primern Inv-1 und Inv-2 angesetzt (Tab. 3.14). Die Produkte der inversen PCR wurden im Agarose Gel aufgetrennt und überprüft ob eine prominente Bande pro Reaktionsansatz vorhanden war. Wenn dies der Fall war, wurden die entsprechenden Banden bei Bedarf ausgeschnitten und aus dem Gel eluiert (Wizard SV Gel & PCR cleanup Kit, Promega). Die extrahierten Amplifikate wurden schliesslich in Sequenzierreaktionen (siehe 3.2.3.9) mit dem Primerpaar KAN-2 FP-1 und KAN-2 RP-1 eingesetzt. Die Sequenzierproben wurden im Sequenzierlabor des Robert Koch-Instituts aufgetrennt und analysiert. Die ermittelten Sequenzen, die das integrierte Transposon flankierten wurden durch Blast-Analyse den Genen zugeordnet in die die Insertion erfolgt war.

Material und Methoden

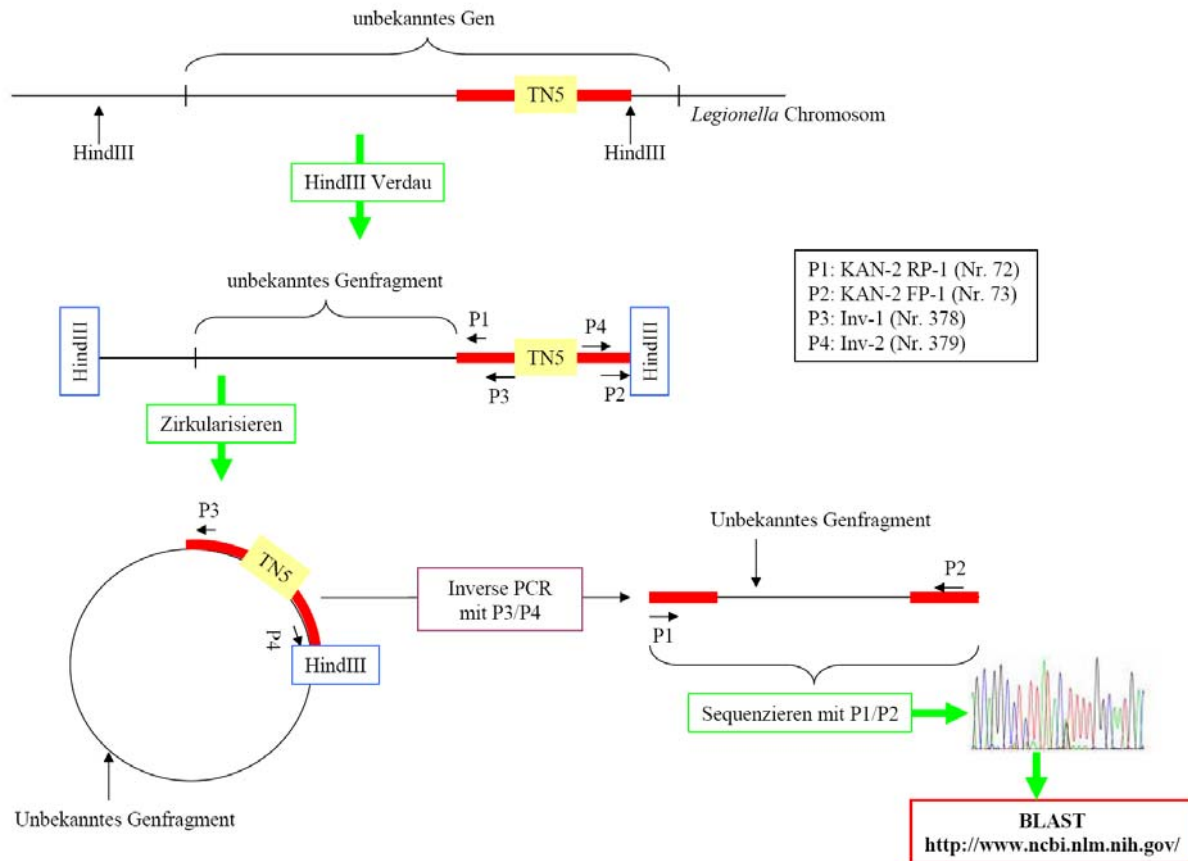


Abb. 3.1 Arbeitsschema bei der Identifizierung von Tn5 Insertionen in *L. pneumophila* Genen.

3.2.15.3 Screen der Tn5 Mutanten im Scattertestverfahren

Der unter 4.2.1 im Ergebnisteil beschriebene Scatterphänotyp wurde genutzt, um *L. pneumophila* Tn5 Insertionsmutanten auf Klone zu untersuchen, die einen solchen Koloniephänotyp zeigen und deshalb aufgrund des Verlusts eines wichtigen Kolonisations- oder Virulenzgens wahrscheinlich in ihrer Vermehrungsfähigkeit in *Acanthamoeba castellanii* attenuiert sind. Dazu wurde von der in Glycerin und Medium eingefrorenen *L. pneumophila* Tn5 Klonbank (die ca. 11.300 verschiedene Klone umfasste) eine Mutterplatte auf BCYE mit Kanamycin erzeugt von denen dann Tochterplatten auf BCYE Agar-Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen und 3 Tage bei 37°C angezogen wurden. Von den Tochterplatten wurde Koloniematerial entnommen und in Infektionsmedium auf eine OD660 von 0,3 (entspricht ca. 1×10^8 Zellen/ml) eingestellt und anschliessend 10.000-fach in Infektionsmedium verdünnt um 1×10^4 Zellen pro ml einzustellen. Um eine MOI (*multiplicity of infection*) von 0,1 zu erhalten, wurden die Amöben auf 1×10^5 Zellen pro ml eingestellt und davon 1 ml mit 1 ml der

Bakterien für 30 min bei 37°C inkubiert. Um Einzelkolonien zu erhalten, wurde dieser Ansatz dann 1:8 in *Acanthamoeba* Infektionsmedium verdünnt und davon 80×100 µl auf BCYE Agarplatten mit Kanamycin ausplattiert, was nach 3-tägiger Inkubation der Platten bei 37°C

Material und Methoden

in durchschnittlich 290 gewachsenen Kolonien pro Platte resultierte, so dass insgesamt 23.200 Klone *gescreent* worden sind. Die 80 Platten wurden wie unter 4.2.1 beschrieben 3 Tage bei 37°C und anschließend bei 25°C inkubiert. Während der Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten täglich begutachtet und während 7 Tagen insgesamt 120 Kolonien mit Scatterphänotyp identifiziert. Diese Klone wurden dann mit der Impföse isoliert und auf BCYE Agar Platten ohne Antibiotikum ausgestrichen. Nach zwei Tagen bei 37°C wurden Glycerolgefrierkulturen daraus hergestellt.

3.2.16 FTIR Messungen des PHB Gehalts

1 Impföse (Öseninnendurchmesser = 1 mm) *L. pneumophila* Philadelphia-1 Bakterienmaterial wurde von Mutterplatten entnommen und in 1ml H₂O bidest suspendiert. 500µl der Suspension wurden dann auf eine frische BCYEα Agarplatte (Tochterplatte) ausplattiert (Drigalski-Spatel) und bei 37°C inkubiert. Nach 72h und 120h wurde Probematerial für die IR-Spektroskopie entnommen.

Äquivalente Mengen Bakterienmaterial wurden in 80 µl H₂O bidest homogenisiert (ca. 20-30 s) und 35 µl der Suspension wurden dann auf das Probenrad (IR-transparentes optisches Trägermaterial aus ZnSe) aufgetragen und in mildem Vakuum im Exikator bei 66 mbar über Sicapent (Phosphorpentoxid mit Trockenmittel; Merck) getrocknet. Der getrocknete Bakterienfilm auf dem Probenrad wurde dann mit einer Deckscheibe aus KBr (wasserlöslich) verschlossen und in das Spektrometer gesetzt. Die verschiedenen Probenpositionen wurden jeweils gegen eine Negativkontrolle (Probenradposition ohne Bakterien) gemessen. Die erhaltenen Spektren stellen den negativen dekadischen Logarithmus des Absorptionsspektrums in *absorbance units* dar, der gegen die Mess-Wellenlänge aufgetragen wurde.

4. Ergebnisse

4.1 Patatin ähnliche Proteine von *L. pneumophila*

Zu Beginn der Arbeiten war bereits bekannt, dass *L. pneumophila* mehrere sekretierte und zellassoziierte Phospholipaseaktivitäten besitzt (siehe 2.4.2). Die Entschlüsselung der Genomsequenzen von insgesamt 4 *L. pneumophila* Stämmen (Philadelphia-1, Lens, Paris, Corby) ermöglichte es, die Datenbanken auf weitere konservierte Effektoren zu durchsuchen, die aufgrund von Sequenzhomologien putative Phospholipaseaktivität besitzen könnten. Interessanterweise stellte sich dabei heraus, dass *L. pneumophila* mindestens 11 weitere Proteine kodiert, die aufgrund ihrer Homologie zu Kartoffel-Patatin putative Phospholipasen sind (Philadelphia-1, Lens: 11 und Lens, Corby: 10). Diese Proteine wurden deshalb Patatin-ähnliche Proteine=patatin-like proteins (PLP, PatA – PatK) genannt (17). Sie stellen den Hauptgegenstand der Untersuchungen im ersten Teil der vorliegenden Arbeit dar.

Bei der Analyse weiterer sequenzierter Genome stellte sich heraus, dass Patatin-ähnliche Proteine innerhalb der belebten Welt, insbesondere innerhalb der Bakterien, sehr weit verbreitet sind (Abb.4.0). Interessanterweise zeigte sich, dass solche Bakterien, die in enger Assoziation mit eukaryontischen Wirtszellen leben, z.B. intrazelluläre Pathogene oder Symbionten, über besonders viele PLP Gene oder eine hohe PLP Dichte im Genom verfügen (z.B. *Mycobacterium tuberculosis*: 8 PLP, *Bradyrhizobium japonikum*: 8 PLP, *Rickettsia prowazekii* Madrid: 2 PLP, *Legionella pneumophila* Philadelphia-1: 11 PLP) (15,17). Offenbar besteht eine Korrelation zwischen der Anzahl von PLP Genen und der Lebensweise des betreffenden Bakteriums. Dies wirft die Frage auf, welcher selektive Druck hinter der Akkumulation der PLP Gene in solchen Bakterien steht, d.h. ob und wie die Genprodukte zur Bakterium-Eukaryont-Interaktion beitragen. Unter allen sequenzierten bakteriellen Genomen waren die vier sequenzierten *L. pneumophila* Stämme diejenigen Bakterien, die die höchste Anzahl (10 bis 11) und auch die höchste genomische Dichte von PLP besaßen.

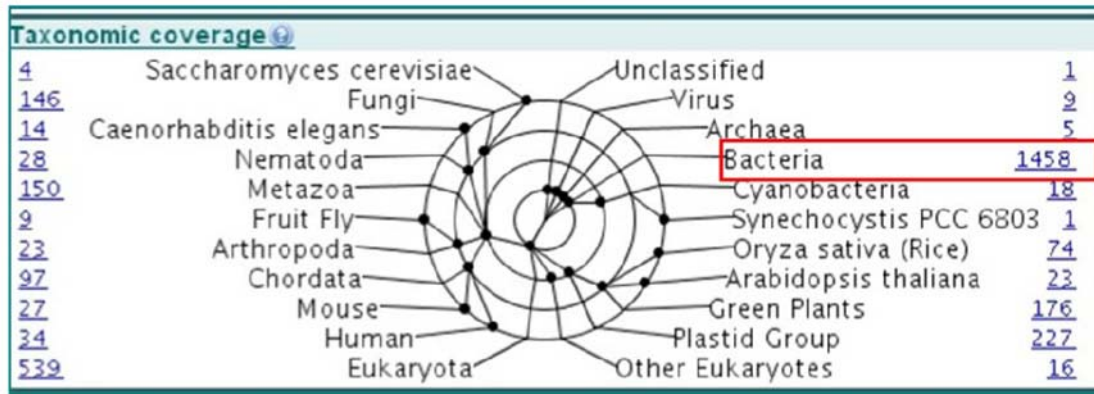


Abb. 4.0 Patatin-ähnliche Proteine sind in allen taxonomischen Reichen (Eukaryoten, Prokaryoten, Viren, Pilze, Archaea) verbreitet. Allein innerhalb der sequenzierten bakteriellen Genome existieren 1458 Gene, die PLP kodieren (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>). Stand: August 2008

Trotz der grossen Zahl von PLP Genen in Bakterien waren diese experimentell weitgehend nicht untersucht. Die einzige Ausnahme bildet *P. aeruginosa* ExoU, welches im Jahr 2003 als Phospholipase A mit Patatindomäne identifiziert worden war und als potentes sekretiertes Zytotoxin mit der Virulenz des Bakteriums korreliert (siehe 2.5.3) (68,169,195,196,203,209,221). Die weite Verbreitung dieser damals nahezu unentdeckten Familie bakterieller putativer Phospholipasen und auch die Frage, weshalb *L. pneumophila* eine so grosse Menge verschiedener Phospholipasen mit möglicherweise überlappenden Substratspezifitäten kodiert, machte die weitere Untersuchung der *Legionella* PLP interessant. Sie versprach neue Einsichten in die Rolle der Phospholipasen für die Pathogenese der Legionelleninfektion.

Die Arbeit ist im ersten Teil auf das *Legionella* PLP PatA fokussiert. Vier der *Legionella* PLP, - PatA, C, F, G - weisen im Protein-Sequenzvergleich eine ausgeprägtere Homologie zu *P. aeruginosa* ExoU auf als die verbleibenden sieben (*expect values* zwischen $1e-16$ und $3e-8$). Interessanterweise zeichnen sich diese vier PLP durch C-terminale Extensionen aus, wie sie auch *P. aeruginosa* ExoU besitzt. Die C-Termini zeigen dabei untereinander und auch zu ExoU keine Sequenzhomologie. Die homologen Proteinbereiche beschränken sich bei allen *L. pneumophila* PLP auf die Regionen, in denen die Patatindomänen lokalisiert sind (ca. 250As). PatA besitzt in dieser Region die ausgeprägteste Sequenzhomologie zu ExoU und wurde deshalb als erstes Enzym der PLP Familie bearbeitet.

4.1.1 In silico Analyse von *L. pneumophila* patA

Das *L. pneumophila* Philadelphia *patA* Gen ist 1866bp lang und kodiert ein Protein von 621As. Das Molekulargewicht beträgt 69,3 kDa. Neben der konservierten Patatindomäne trägt das Protein keine weiteren konservierten Sequenzbereiche oder Domänen, die mit signifikanter Homologie identifiziert werden können. Das *L. pneumophila* *patA* Gen ist in

Ergebnisse

seiner Orientierung entgegengesetzt zu den flankierenden Genen *legU2* und *lpg2832* orientiert (Abb. 4.1). Daher ist es offenbar nicht in einem Operon organisiert.



Abb. 4.1 Genomischer Kontext von *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA*. Die Beschriftung in der unteren Bildhälfte bezeichnet die kodierten Proteine. (Modifiziert nach NCBI Sequence viewer 2.0.β)

Upstream zu *patA* sind die Gene *legU2* und *sidH* lokalisiert. LegU2 trägt eine konservierte U-Box-Domäne, die zur Superfamilie der „ring finger Domänen“ gehört (pfam00097), welche Protein-Protein Interaktionen vermitteln (122). U-Box-Domänen Proteine sind typische eukaryontische Proteine, die an der Ubiquitinmarkierung von Proteinen beteiligt sind, die degradiert werden sollen (10,121). Das nächste Protein, welches *upstream* von *patA* kodiert ist, ist SidH, ein neuerlich identifiziertes Dot/Icm abhängig sekretiertes Protein, welches keine konservierten Domänen trägt, aber in *L. pneumophila* Philadelphia-1 zwei Paraloge besitzt, nämlich SdhA und SdhB (129). *sdhA knockout* Mutanten replizieren wesentlich schlechter intrazellulär im Makrophagenmodell, das Ausschalten aller drei Gene der sogenannten *sdhA*-Familie führt zu vollständigem Verlust der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila*. SdhA ist an der Verhinderung des Wirtszelltodes infizierter Zellen beteiligt, eine genaue Rolle für SidH in der Pathogenese ist nicht bekannt (129). *Downstream* zu *patA*, jedoch entgegengesetzt orientiert, befindet sich *lpg2832*, welches weder konservierte Proteindomänen kodiert, noch zu einem bekannten Protein homolog ist. *yciA*, an zweiter Stelle *downstream* lokalisiert, kodiert eine Thioesterase, die in vielen bakteriellen Genomen konserviert vorliegt. Thioesterasen spalten Thioester in Thiol und Karboxylsäure. Es wird angenommen, dass YciA eine Rolle in der Membranbiogenese von Bakterien spielt (234). Das *lpg2834* Genprodukt ist uncharakterisiert, besitzt jedoch aufgrund seiner in sehr vielen Bakterien konservierten C1 RNA Bindedomäne der Tex Superfamilie (COG2183) eine putative Funktion als akzessorischer Transkriptionsfaktor. Das *tex* Gen wurde als *Bordetella pertussis* Virulenzgen charakterisiert und ist nach seiner Rolle bei der Toxin Expression benannt worden (76). Der *patA* Locus ist unter den derzeit vier sequenzierten *L. pneumophila* Stämmen nur in *L. pneumophila* Philadelphia-1 und Paris konserviert. Das Gencluster *sidH/legU2/patA* fehlt in den Stämmen Lens und Corby (Abb. 4.2).

Ergebnisse

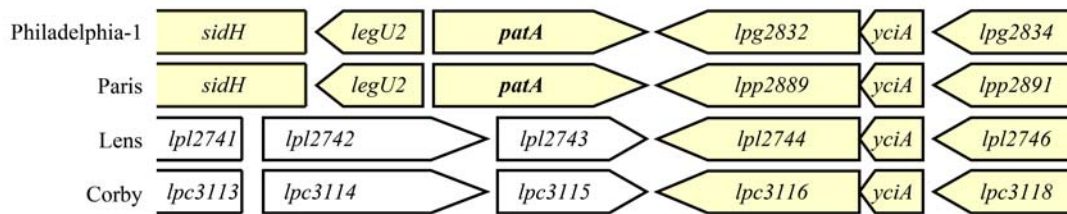


Abb. 4.2 Der *patA* Lokus ist in *L. pneumophila* Philadelphia-1 und Paris konserviert. Orthologe Gene sind übereinanderstehend und gleichfarbig gekennzeichnet. In *L. pneumophila* Lens und Corby fehlt ein *patA*-Homolog sowie dessen *upstream*-Bereich inklusive der Gene *legU2* und *sidH*. Die Gene *lpl2743/lpc3115* inklusive deren *upstream* lokalisierter Gene sind Orthologe von *lpg2828* (und *upstream*) bzw. *lpp2882* (und *upstream*).

4.1.1.1 Sequenzhomologien von *L. pneumophila* PatA und *P. aeruginosa* ExoU

ExoU, ein sehr potentes Zytotoxin von *P. aeruginosa*, besitzt im Vergleich zu PatA einen um ca. 70As verlängerten N-Terminus und hat eine Gesamtgröße von 687As. Das Molekulargewicht beträgt 74kDa. Die Proteinhomologie beider Enzyme erstreckt sich über die etwa 300As, in denen die Patatindomäne lokalisiert ist (*expect value* 1e-12) (Abb. 4.3). 46% der hier konservierten Aminosäuren haben ähnliche biochemische Eigenschaften, 27% sind identisch (Abb. 4.3).



Abb. 4.3 Aminosäuresequenzvergleich der Gesamtproteine *L. pneumophila* Philadelphia-1 PatA und *P. aeruginosa* PA103 ExoU. Die Proteine besitzen homologe, N-terminale Regionen, die die Patatindomäne umfassen und sich über ca. 300 Aminosäuren erstrecken. Die vier Patatindomänen-spezifischen konservierten Proteinregionen (Oxyanionenloch, Serin Hydrolase Motiv, konserviertes Prolin, katalytisch aktives Aspartat) sind durch rote Boxen markiert (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Rabin und Hauser (2005) zeigten in einer Studie, in der randomisiert Transposoninsertionen in *exoU* eingefügt wurden, dass mindestens 5 Proteinregionen für die Zytotoxizität und die

Ergebnisse

Phospholipaseaktivität des Proteins notwendig sind (Abb. 4.4)(174). PatA besitzt Homologie zu insgesamt 3 der 5 für diese ExoU Funktionen notwendigen Proteinregionen. Alle 3 konservierten Regionen liegen in der Patatindomäne. Die C-terminale Region von ExoU ist für dessen intrazelluläre Lokalisation und auch die Phospholipaseaktivität (und Toxizität) essentiell (69,175). Die C-Termini beider Proteine weisen zueinander oder zu anderen Proteinen keine signifikante Ähnlichkeit auf (Abb. 4.3, 4.5).

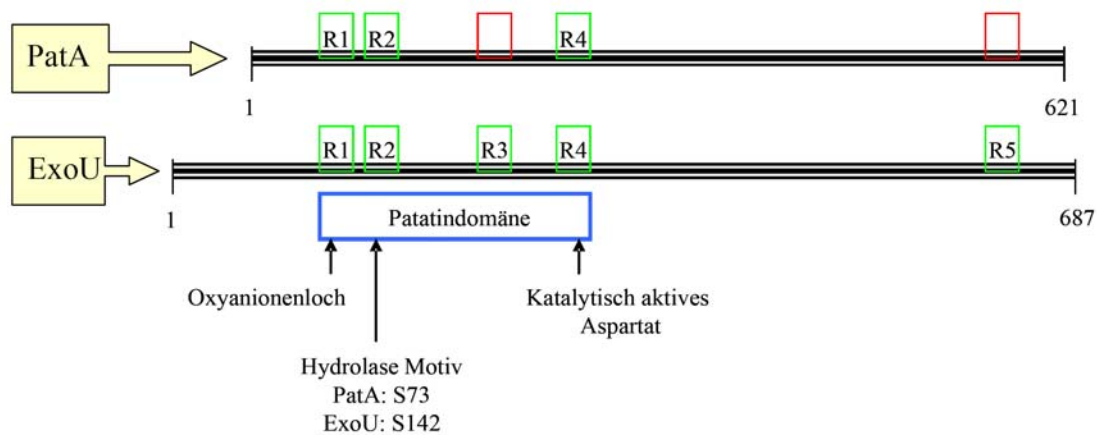


Abb. 4.4 Fünf funktionelle Regionen in *P. aeruginosa* ExoU (174) und drei homologe Regionen in PatA. Die Regionen R1 (Oxyanionenloch), R2 (Hydrolase Motiv), und R4 (katalytisch aktives Aspartat) sind in beiden Proteinen konserviert. Region R3 und R5 sind in PatA nicht konserviert.

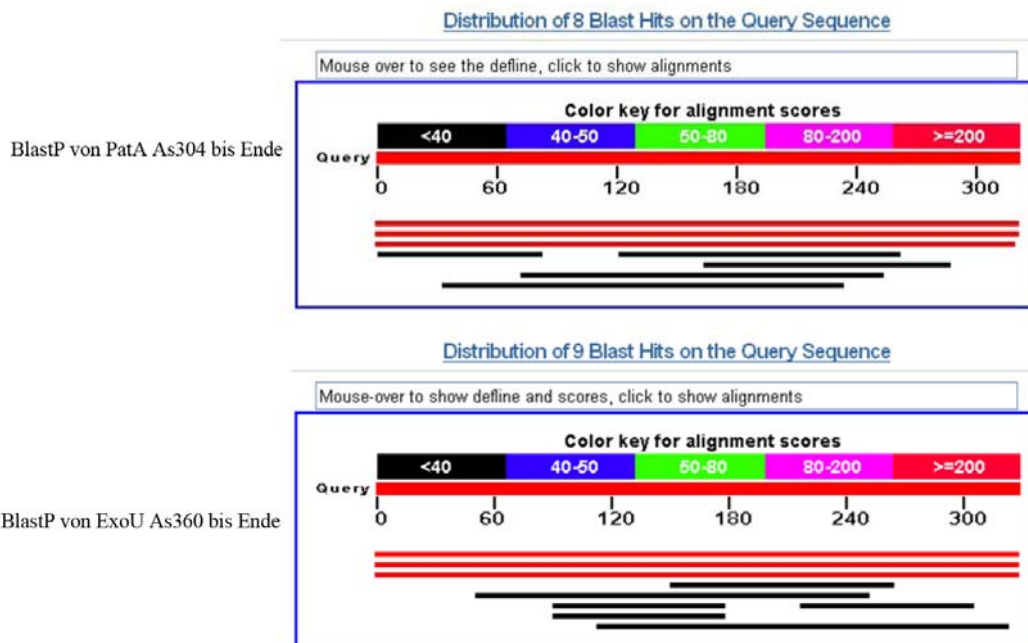


Abb. 4.5 Die C-terminalen Regionen von *L. pneumophila* PatA und *P. aeruginosa* ExoU weisen keine signifikante Homologie untereinander oder zu anderen bekannten Proteinen auf (BlastP). Bei beiden Blast Ergebnissen sind drei rote Balken starker Homologie zu sehen. PatA aus *L. pneumophila* Philadelphia-1 ist doppelt annotiert und zusätzlich in *L. pneumophila* Paris konserviert. ExoU ist dreifach annotiert und erscheint daher in drei getrennten Balken (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Ergebnisse

4.1.2 Expressionsanalysen der *L. pneumophila* PLP Gene

Aufgrund der von Brüggemann *et al.* während der Amöbeninfektion gewonnenen Expressionsdaten, welche nahezu das gesamte *L. pneumophila* Genom umfassen, war bekannt, dass die Transkription der zu untersuchenden PLP Gene während verschiedener Stadien der Amöbeninfektion reguliert ist (29). 4 PLP Gene sind während der Expression von Virulenzeigenschaften in der Infektion von *A. castellanii* stark „hoch“ reguliert (*patA*=11-fach, *patD*=8-fach, *patE*=11-fach, *patI*=9-fach), was auf deren Beteiligung am Verlassen der Wirtszelle oder der Infektion einer neuen Wirtszelle hinweisen könnte (Abb. 4.6).

Um die biochemischen Eigenschaften von PatA sowie der weiteren 10 *L. pneumophila* PLP unter Laborbedingungen zu untersuchen, war es von Interesse, welche der Proteine unter Laboranzuchtbedingungen in BYE Medium vom Bakterium exprimiert werden. Diese Information war für weitere Experimente von Bedeutung, die grösstenteils mit in BYE Medium angezogenen Kulturen erfolgen sollten, da für nicht exprimierte Proteine zunächst induzierende Bedingungen hätten evaluiert werden müssen. Für unsere Fragestellung war eine quantitative Aussage zur Expression nicht entscheidend. Daher erfolgte diese Untersuchung durch nicht-quantitative RT (*reverse transkriptase*) PCR zu 5 verschiedenen Zeitpunkten der Vermehrung in Laborkultur (zwei sind in Abb. 4.7 gezeigt).












	<i>lpg</i> Nr.	8h vs. 14h	Regulation
<i>patA</i>	<i>lpg2831</i>	10.70	
<i>patB</i>	<i>lpg2807</i>	3.39	
<i>patC</i>	<i>lpg2401</i>	2.60	
<i>patD</i>	<i>lpg2317</i>	8.00	
<i>patE</i>	<i>lpg1944</i>	11.16	
<i>patF</i>	<i>lpg1426</i>	-1.37	
<i>patG</i>	<i>lpg1227</i>	1.20	
<i>patH</i>	<i>lpg0952</i>	1.12	
<i>patI</i>	<i>lpg0670</i>	8.94	
<i>patJ</i>	<i>lpg0290</i>	-1.71	
<i>patK</i>	<i>lpg0014</i>	2.14	

Abb. 4.6 Vier *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP Gene (*patA*, *D*, *E*, *I*) werden während der Expression der bakteriellen Virulenzeigenschaften verstärkt exprimiert. Die Expression der *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP Gene wurde beim Übergang der Bakterien in die transmissive Phase am Ende der intrazellulären Replikation in *Acanthamoeba castellanii* mit der Expression während der replikativen Phase im gleichen Wirtszellmodell verglichen. *L. pneumophila patA*, *D*, *E* und *I* wurden während der späten Infektionsphase 8 bis 11-fach stärker exprimiert als während der früheren Wachstumsphase (29).

Ergebnisse

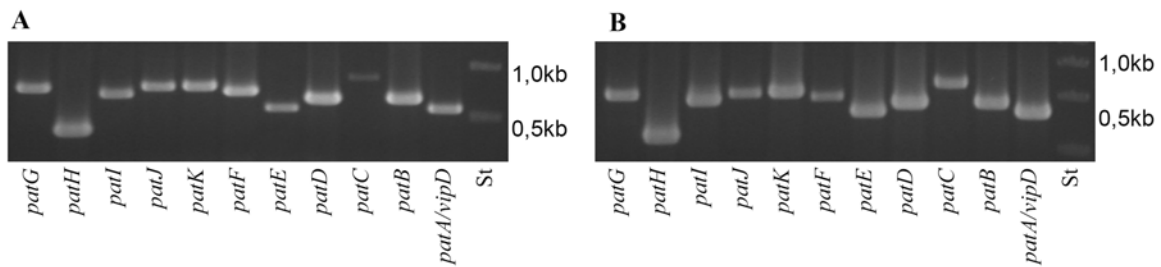


Abb. 4.7 Die *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP Gene *patA* – *patK* werden während der Anzucht in BYE Laborkulturmedium in der exponentiellen (A) und stationären Wachstumsphase (B) exprimiert. In der RT-PCR waren Transkripte aller 11 PLP Gene detektierbar. Als Positiv-Expressionskontrolle und als Kontrolle für DNA-Kontamination der RNA-Präparationen wurde das konstitutiv exprimierte Gyrase-Gen gewählt (nicht gezeigt; zwei Wiederholungen).

In der RT-PCR Untersuchung wurden zu den fünf untersuchten Zeitpunkten jeweils von den 11 *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP Genen *patA* bis *patK* Transkripte detektiert. Dies zeigte, dass die Gene in der Laborkultur exprimiert wurden.

Da die Studie vor allem auf die Untersuchung der Rolle von PatA für *L. pneumophila* ausgerichtet war, wurde für dieses Gen auch eine quantitative Western Blot Analyse durchgeführt. Hierzu wurde das *gfp* Gen unter Kontrolle der putativen *patA* Promoterregion (*PpatA*) *in trans* in *L. pneumophila* Philadelphia-1 eingebracht (Plasmid pPA31=pBCKS+*PpatA*+*gfp*) und dessen Expression während des Wachstums in BYE Laborkulturmedium untersucht. Die Expression des Markerproteins (GFP) konnte so quantitativen Aufschluss über die Expression des *patA* Gens in Laborkulturmedium geben. Als Referenz wurde das im Labor vorhandene Plasmid pBCKS+*Pmip*+*gfp* genutzt, welches das *gfp* Gen unter Kontrolle des (unter den gegebenen Bedingungen konstitutiv aktiven) *mip* Promoters (*Pmip*) trägt (Abb.4.8).



Abb. 4.8 *L. pneumophila* Philadelphia-1 exprimierte GFP unter Kontrolle des *patA* Promoters (*PpatA*) oder unter Kontrolle des *mip* Promoters (*Pmip*) während der Replikation in BYE Flüssigmedium. Lysate gleicher Bakterienzahlen wurden in der SDS-PAGE aufgetrennt und mit anti-GFP Antikörpern im Western Blot beprobt. FL: frühe logarithmische Phase, L: logarithmische Phase, SL: späte logarithmische Phase, FS: frühe stationäre Phase, S: stationäre Phase.

Bis zur späten exponentiellen Wachstumsphase wurde eine relativ konstante Menge GFP Protein unter *PpatA* Kontrolle von den Bakterien exprimiert. In der stationären Phase befand sich eine deutlich erhöhte Menge von GFP Protein in den Proben. Die Aktivität von *PpatA* wird also vom Bakterium reguliert und ist in der stationären Wachstumsphase induziert.

Ergebnisse

4.1.3 Rekombinante Expression der *L. pneumophila* PLP in *E. coli*

Um einen vergleichenden Überblick über die lipolytischen Aktivitäten der elf *Legionella* PLP zu gewinnen, wurden die Gene rekombinant in *E. coli* exprimiert und Zelllysate der Expressionsklone in Lipidhydrolyseassays analysiert (Abb. 4.9, 4.10).

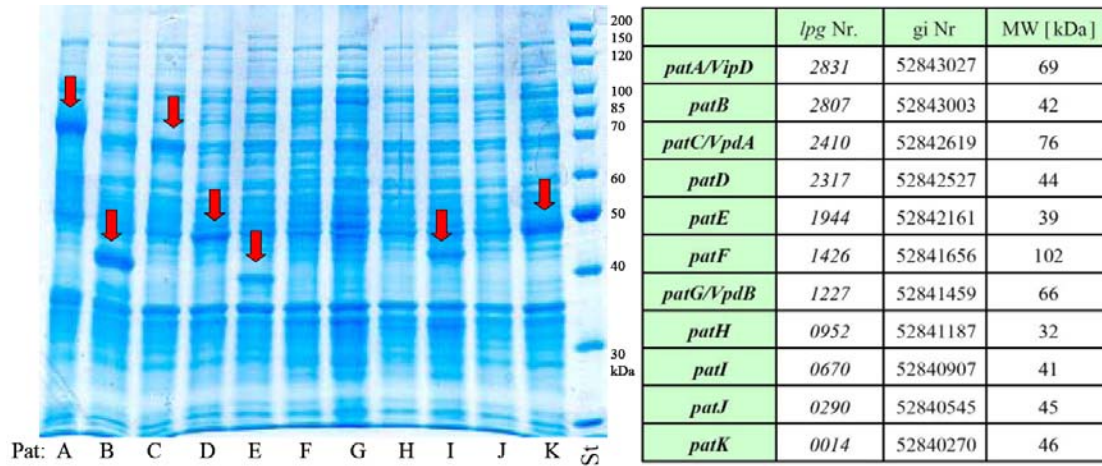


Abb. 4.9 *L. pneumophila* Philadelphia-1 PatA, B, C, D, E, I, K sind in Zelllysaten der *E. coli* Expressionsklone, die im SDS PAGE Gel aufgetrennt wurden, als dicke Banden mit den erwarteten Molekulargewichten sichtbar. PatF, G, H, J sind nicht als Einzelbanden zu erkennen.

Obwohl im SDS PAGE Gel keine Expression von PatF, G, H und J nachzuvollziehen war, wurden auch diese Lysate auf die Fähigkeit getestet, Fettsäuren von PLA- (DPPG und DPPC) und LPLA- (MPLPG und MPLPC) Substraten sowie von einem Lipasesubstrat (1-MPG) abzuspalten (Abb. 4.10).

Ergebnisse

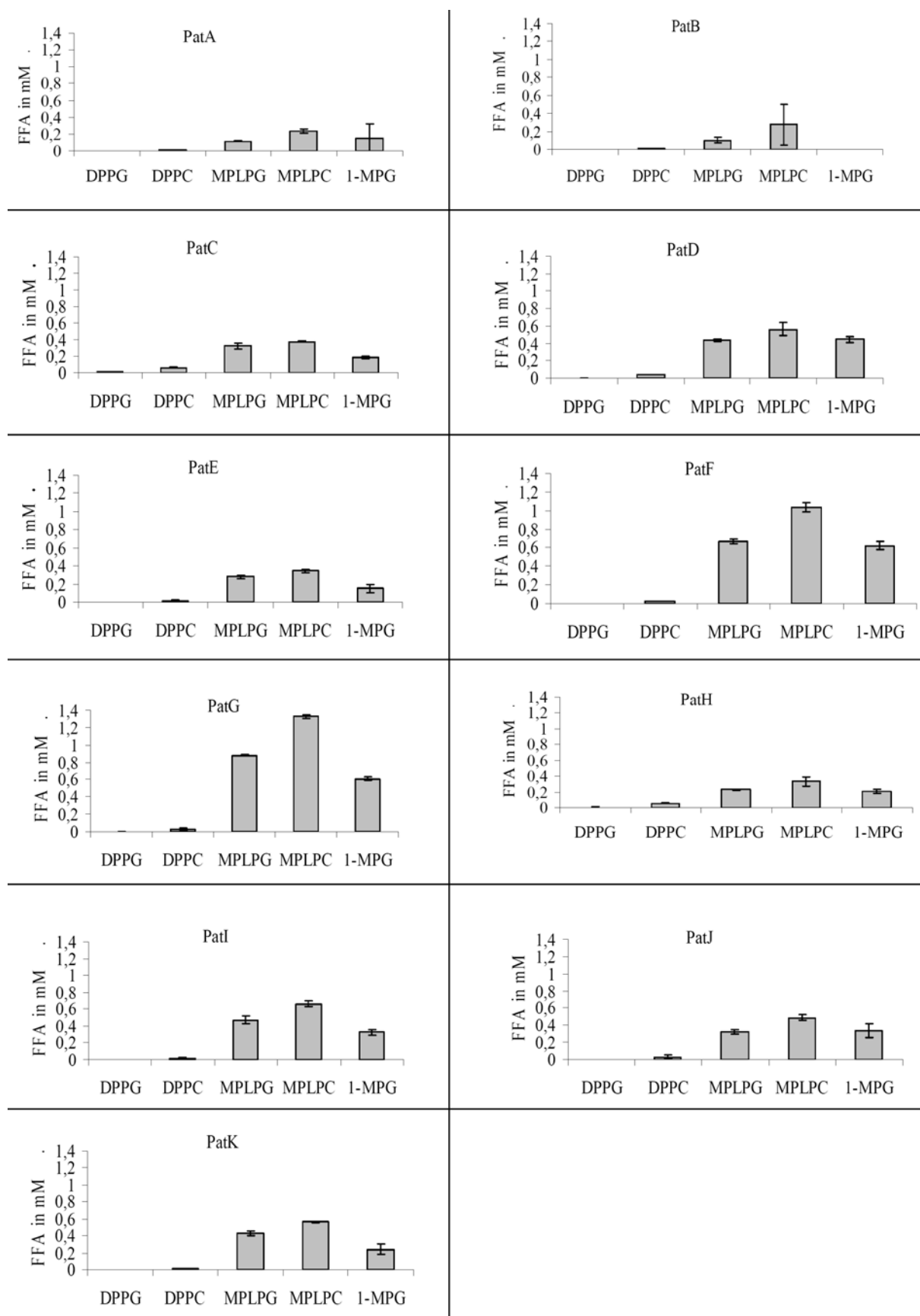


Abb. 4.10 Die *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP PatA bis PatK exprimierenden *E. coli* Klone zeigten erhöhte LPLA (PatA bis PatK) und Lipaseaktivität (PatA, PatC bis PatK). Zellpelletlysate wurden für 23h mit den Substraten DPPG, DPPC, MPLPG, MPLPC und 1-MPG inkubiert. Abgezogen wurden Mediumkontrolle und *E. coli* Kontrolle. Der Kontrollstamm kodierte ein inaktives Proteinfragment des *patAS73A* Gens. Die Daten repräsentieren Doppelwerte.

Ergebnisse

Abb. 4.10 zeigt, dass die Lysate aller 11 getesteten PLP *E. coli* Expressionsklone eine erhöhte LPLA Aktivität gegenüber MPLPG und MPLPC besitzen, wobei MPLPC stets das bevorzugte Substrat war. Zusätzlich wurden mit - Ausnahme der *patB* exprimierenden Klone - durch alle Lysate Fettsäuren von 1-MPG abgespalten, was Lipaseaktivität anzeigt.

4.1.4 Phänotypische Charakterisierung von *L. pneumophila* Philadelphia-1 PatA

In der stationären Wachstumsphase exprimieren die Bakterien als Folge sich verknappender Nährstoffreserven Virulenzfaktoren bzw. ihren transmissiven Phänotyp (siehe 2.2.2). Die Expression von *patA* ist - wie in dieser Arbeit gezeigt - in der stationären Wachstumsphase von Laborkulturen sowie zum Ende des intrazellulären Replikationszyklus in Amöben induziert (29). Das könnte bedeuten, dass das Protein für die virulente Phase / die Virulenz von *L. pneumophila* wichtig ist. Die Generation einer *L. pneumophila patA knockout* Mutante und deren phänotypische Analyse würde zeigen wie sich der Verlust des putativen Virulenzfaktors PatA auf die Eigenschaften von *Legionella* und dessen Interaktion mit Wirtszellen auswirkt. Bevor weitere Analysen folgen konnten, war zu prüfen, ob die generierte *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Mutante in Laborkultur wildtypähnliche Vermehrungseigenschaften zeigt. Sollte der Verlust des Gens bereits unter diesen Bedingungen schwerwiegende physiologische Beeinträchtigungen für das Bakterium darstellen, würde dies die Bearbeitung der Mutanten erschweren.

4.1.4.1 *L. pneumophila patA* Insertionsmutanten vermehren sich in Laborkultur

Um der eben aufgeworfenen Fragestellung nachzugehen wurden Kulturen angesetzt und die Replikation der Bakterien durch Messen der Kulturdichte verfolgt (Abb. 4.11).

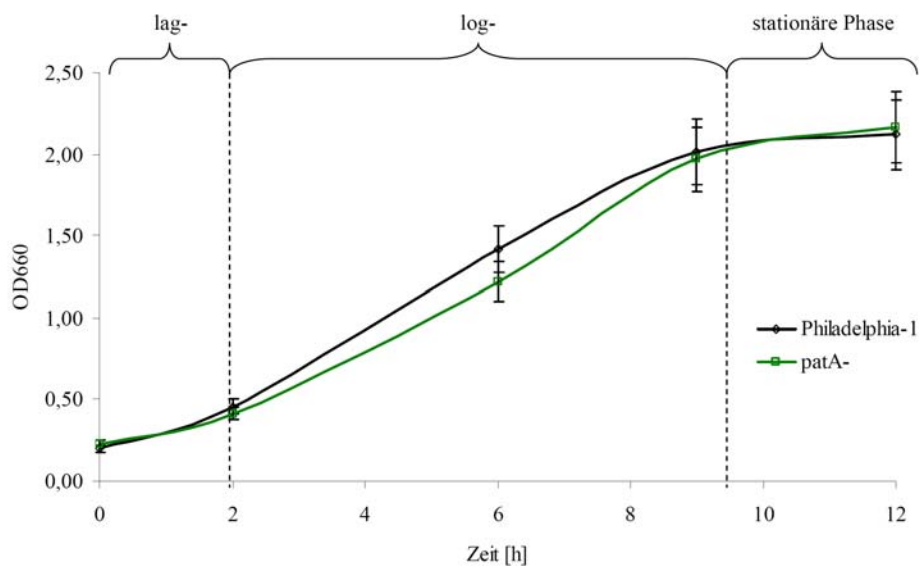


Abb. 4.11 Die *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA knockout* Mutante (Klon M1-8) vermehrte sich in BYE Nährbouillon auf Wildtypniveau. Der Wildtypstamm sowie die *patA* Mutante traten nach ca. 9-10h in die stationäre Wachstumsphase ein. OD=optische Kulturdichte.

Ergebnisse

Die Mutanten vermehrten sich in BYE Medium im Vergleich zum Wildtypstamm unverändert. Beide Kulturen traten nach etwa 9-10 Stunden mit dem Erreichen einer Kulturdichte von OD₆₆₀ 2 in die stationäre Phase ein, die durch eine Stagnation der Zelldichte gekennzeichnet ist. Die wildtypähnliche Replikation der *patA* Mutante war somit unter Laborkulturbedingungen gegeben.

4.1.4.2 Lipolytische Aktivität von *L. pneumophila patA* Mutanten und Überexpressionsklonen

Die lipolytische Aktivität von *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Mutanten wurde in Lipidhydrolyseassays untersucht. Dabei wurden Zellpelletlysate und Kulturüberstände getrennt bearbeitet, um Aufschluss über die sekretierte und zellpelletassoziierte Aktivität zu erhalten. Die Annahme, dass PatA Phospholipaseaktivität besitzt, liess erwarten, dass *L. pneumophila patA knockout* Mutanten reduzierte lipolytische Aktivität besitzen. PatA wird durch das Dot/Icm TypIVB Proteinsekretionssystem in Wirtszellen injiziert (211,228). Daher wurde davon ausgegangen, dass das Protein bei der Anzucht der Erreger in Flüssigmedium auch in das Laborkulturmedium abgegeben werden kann, eine mögliche Veränderung der lipolytischen Aktivität also im Kulturüberstand und im Zellpellet detektierbar sein könnte (Abb. 4.12).

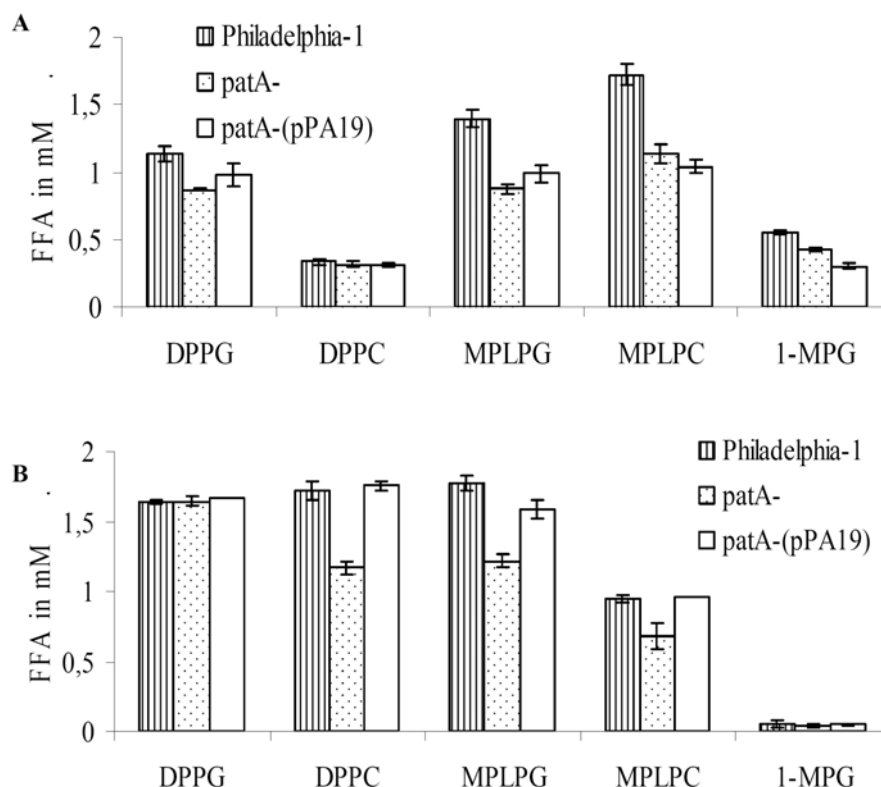


Abb. 4.12 *L. pneumophila patA*-Mutanten Kulturüberstände und Zellpelletlysate haben reduzierte lipolytische Aktivitäten. Kulturüberstände (A) und Zellpelletlysate (B) der stationären Wachstumsphase aus BYE Medium wurden 20h (A) bzw. 3h (B) mit den Substraten DPPG, DPPC, MPLPG, MPLPC und 1-MPG inkubiert. *patA*-(pPA19)=*patA*-Komplementante mit pMMB2002+*patA* *in trans* (Klon K4-1). Die Daten repräsentieren Dreifachwerte. Medium- und Pufferkontrollen wurden von den Meßwerten abgezogen (zwei Wiederholungen).

Ergebnisse

Sowohl die Kulturüberstände als auch Zellpelletlysate der *L. pneumophila patA* Mutante setzten weniger Fettsäuren aus den Substraten frei als der Wildtypstamm. Die Kulturüberstände hatten im Vergleich zum Wildtyp reduzierte PLA-, LPLA- und Lipase-Aktivität gegenüber den Substraten DPPG, MPLPG, MPLPC und 1-MPG. Der komplementierende Stamm *L. pneumophila patA*-(pPA19) zeigte bei keiner der reduzierten sekretierten Aktivitäten eine wildtypähnliche lipolytische Aktivität. Die Zellpelletlysate der *patA* Mutante wiesen ebenfalls signifikant reduzierte PLA und LPLA Aktivität auf, allerdings mit anderer Substratspezifität. Zellpelletlysate besaßen gegenüber DPPC, MPLPG und MPLPC signifikant reduzierte lipolytische Aktivität, die jeweils beim komplementierenden Stamm wieder auf Wildtypniveau angehoben war. Die Zellpelletlysate der getesteten *L. pneumophila* Stämme besaßen keine 1-MPG spezifische Lipaseaktivität.

4.1.4.3 *L. pneumophila patA* Mutanten besitzen reduzierte hämolytische Aktivität

L. pneumophila hat membranzerstörende Eigenschaften und besitzt hämolytische Aktivität (13,21,75,120), die auch auf sekretierte und zellassoziierte PLA Aktivität zurückgeführt werden könnte (15,70,73). Die Fähigkeit rote Blutkörperchen zu lysieren, wurde bei *L. pneumophila patA* knockout Mutanten untersucht, denn aufgrund der reduzierten DPPC spezifischen lipolytischen Aktivität in Zelllysaten der *patA* Mutante könnte die Fähigkeit zur Hämolyse bei diesen Mutanten reduziert sein (Abb. 4.13).

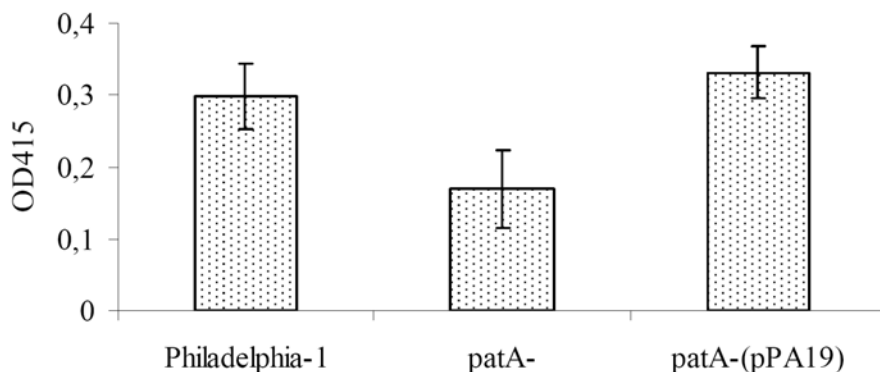


Abb. 4.13 *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Mutanten (Klon M1-8) besitzen im Vergleich zum Wildtypstamm reduzierte hämolytische Aktivität gegenüber roten Blutkörperchen. Im Komplementationsstamm *patA*-(pPA19) (Klon K4-1) ist die hämolytische Aktivität auf Wildtypniveau wiederhergestellt. Balken und Standardabweichungen repräsentieren Doppelwerte. Die Pufferkontrolle (PBS) wurde von den Meßwerten abgezogen (zwei Wiederholungen).

Die hämolytische Aktivität der *L. pneumophila patA* Mutante betrug 56% der Wildtypaktivität und war damit signifikant reduziert. Der Komplementationsstamm *L. pneumophila patA*-(pPA19) zeigt hämolytische Aktivität auf Wildtypniveau. Durch die Hämolyseassays mit menschlichem Blut wurde die aufgrund der Lipidhydrolyse-Experimente (siehe 4.1.4.2) gemachte Vermutung, dass PatA hämolytische Eigenschaften besitzen könnte,

Ergebnisse

als zutreffend bestätigt. PatA besitzt, vermutlich aufgrund der Fähigkeit DPPC - einem Haupt-Phospholipid eukaryontischer Membranen - zu hydrolysieren, hämolytische Eigenschaften.

4.1.4.4 Untersuchung der intrazellulären Vermehrung von *L. pneumophila patA* Mutanten

In einem nächsten Schritt wurde geprüft, ob *L. pneumophila patA* Mutanten in der Lage sind, sich in Wirtszellen zu vermehren. Dazu wurden *patA* Mutanten in den Stämmen Philadelphia-1 und 130b in Koinfektionen mit *A. castellanii* und anschliessend in humanen U937 Makrophagen auf intrazelluläre Vermehrung getestet (Abb. 4.14, 4.15).

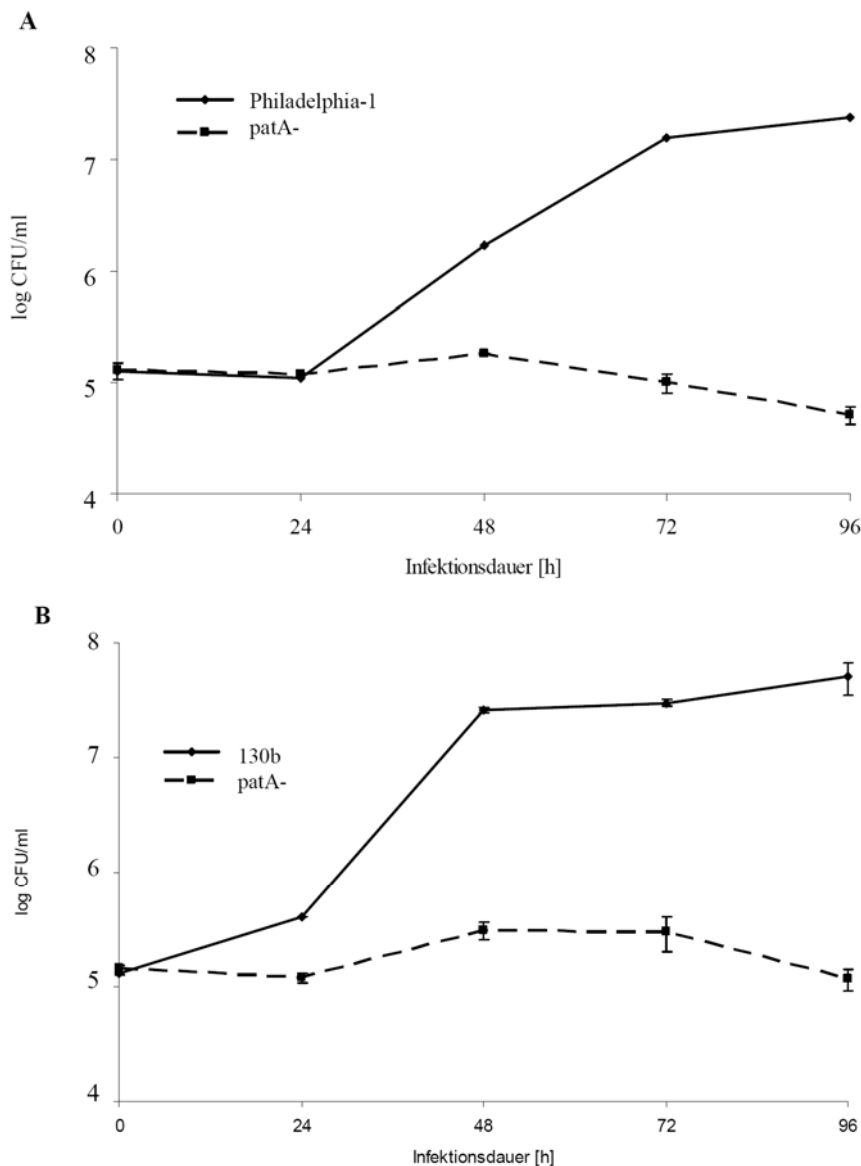


Abb. 4.14 *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Mutanten (Klon M1-8) (A) und *L. pneumophila* 130b *patA* Mutanten (Klon 4) (B) sind für die Vermehrung in *A. castellanii* attenuiert. Die Wildtypstämme vermehrten sich innerhalb von 96h um den Faktor 1000, die *patA* Mutanten beider Stämme vermehrten sich nicht. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte (drei Wiederholungen).

Ergebnisse

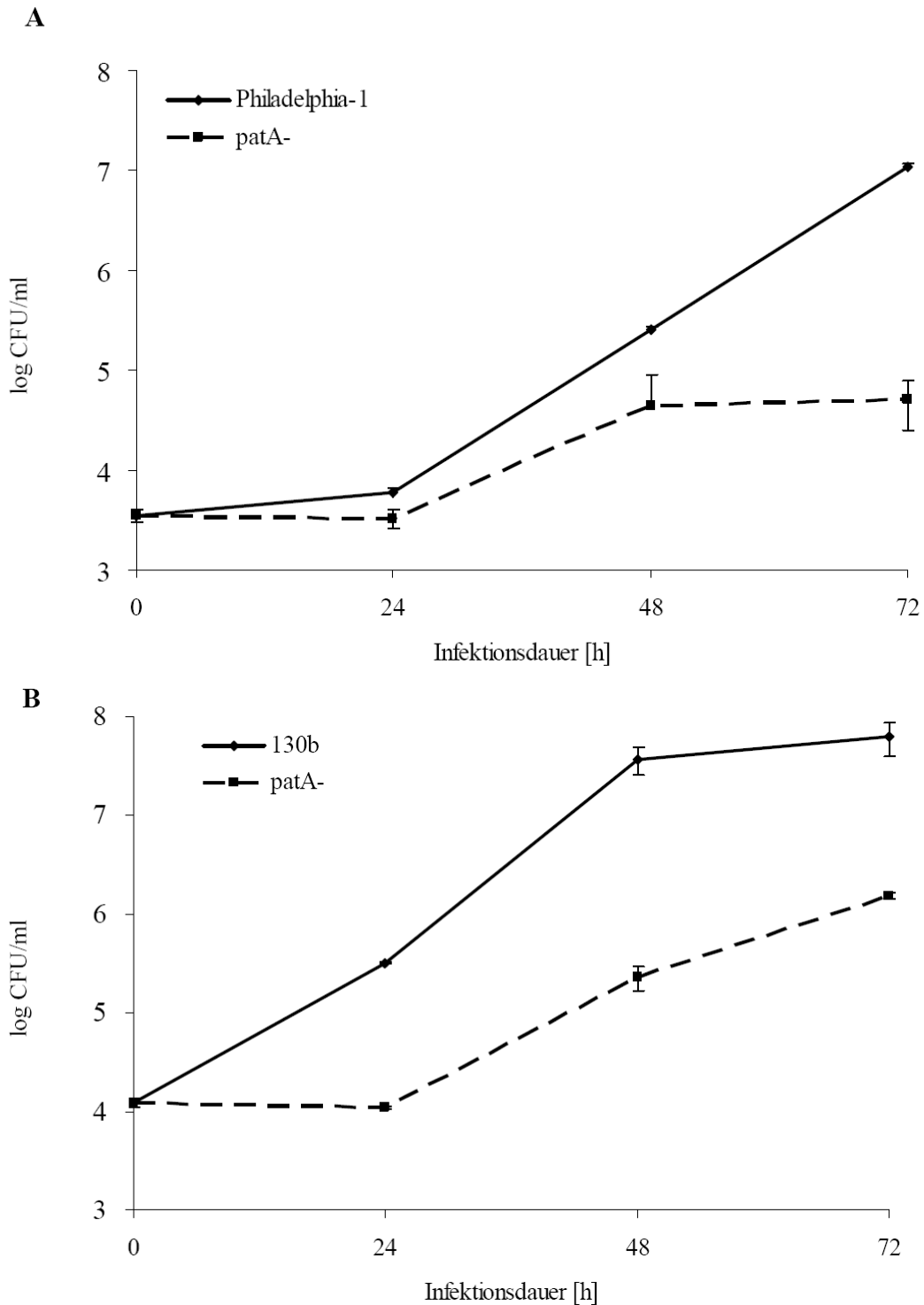


Abb. 4.15 *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Mutanten (Klon M1-8) (A) und *L. pneumophila* 130b *patA* Mutanten (Klon 4) (B) sind für die Vermehrung in U937 Makrophagen attenuiert. Die Wildtypstämme vermehrten sich innerhalb von 72h um den Faktor 10000, die *patA* Mutanten beider Stämme vermehrten sich 10 bis 100-fach. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte (drei Wiederholungen).

In beiden Infektionsmodellen, sowohl in *A. castellanii* Amöben als auch in humanen U937 Makrophagen vermehrten sich die beiden Wildtypstämme 130b und Philadelphia-1 während der Infektionsdauer (96h bzw. 72h) um 3 bis 4 Zehnerpotenzen (Abb.4.14, 4.15). Die *patA*

Ergebnisse

Mutanten beider Stämme zeigten eine attenuierte intrazelluläre Vermehrung. Dieser Phänotyp war in den Amöbeninfektionen ausgeprägter, hier fand keine Vermehrung statt. Im Makrophagen-Infektionsmodell vermehrten sich die *L. pneumophila* 130b *patA* Mutanten 100- und Philadelphia-1 *patA* Mutanten 10-fach.

Da die Komplementation der attenuierten intrazellulären Vermehrung der *L. pneumophila patA* Mutanten beider *L. pneumophila* Stämme (Philadelphia-1 und 130b) Schwierigkeiten bereitete, wurden mehrere Strategien erprobt, um das Wildtypgen wieder in die Mutanten einzubringen und funktionelle Komplementation zu erhalten:

1 - Einbringen des plasmidkodierten Wildtypgens in die Mutante

Das *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Gen wurde inklusive des putativen nativen Promoters in die Plasmide pBCKS (ein *high copy* Vektor) und pMMB2002 (ein *low copy* Vektor) kloniert und anschliessend in zwei unabhängig generierte *patA* Mutanten eingebracht. So generierte Komplementationsklone wurden im Infektionsmodell auf intrazelluläre Replikation getestet.

2 - Einbringen des plasmidkodierten Wildtypgens in die Mutante und anschliessende Selektion der Komplementanten im Infektionsmodell

Wie in Punkt 1, jedoch wurden die Klongemische nach Elektroporation der Komplementationsvektoren direkt in Infektionen eingesetzt. Nach 24 Stunden Infektionsdauer wurden die Infektionen ausplattiert und Einzelklone isoliert (d.h. auf Klone mit komplementiertem intrazellulären Replikationsvermögen selektiert). Diese Einzelklone wurden in einer zweiten Infektion auf intrazelluläre Replikation getestet.

3 - Chromosomale Reintegration des Wildtypgens in die Mutante

Das *L. pneumophila* Philadelphia-1 *patA* Gen wurde inklusive flankierender Regionen in pLAW344 kloniert. pLAW344 wird in *L. pneumophila* nicht repliziert, integriert jedoch chromosomal durch homologe Rekombination. Der Vektor trägt das *sacB* Gen, weshalb rekombinierte Klone auf Sukroseresistenz selektiert werden können. Der Vektor wurde von H. Shuman (New York, USA) zur Verfügung gestellt (93).

4 - Zugabe von rekombinant gereinigtem PatA Protein zur Infektion mit *patA* Mutanten

Mit *L. pneumophila patA*-Mutanten wurden Wirtszellinfektionen durchgeführt und PatA in 24h Intervallen zugegeben.

Eine Komplementation der attenuierten intrazellulären Vermehrung durch Einbringen des Wildtypgens bzw. Proteins wurde mit keiner der Strategien erreicht. Wegen möglicher *second site* Mutationen muss die Integrität der in der Arbeit verwendeten *patA* Mutanten deshalb bezweifelt werden. Aus diesem Grund wurde in den folgenden Teilen der Arbeit von der weiteren Untersuchung des attenuierten Phänotyps der *L. pneumophila patA* Mutanten

Ergebnisse

abgesehen. Der Fokus der Untersuchungen wurde auf die Charakterisierung von aufgereinigtem Protein sowie der intrazellulären Lokalisation von PatA gelegt.

4.1.5 Lipolytische Aktivität von rekombinant aufgereinigtem PatA und PatAS73A

E. coli patA Expressionsklone waren verstärkt in der Lage, Fettsäuren von MPLPG, MPLPC und in geringerem Maße von 1-MPG abzuspalten. Zur Beurteilung der lipolytischen Aktivität von *L. pneumophila* PatA war es nötig, das Protein aufzureinigen und seine Aktivität ohne den bakteriellen Hintergrund zu untersuchen. Das Protein wurde deshalb rekombinant in *E. coli* exprimiert und anschliessend über dessen N-terminalen His₆-Tag chromatografisch aufgereinigt (Abb.4.16).

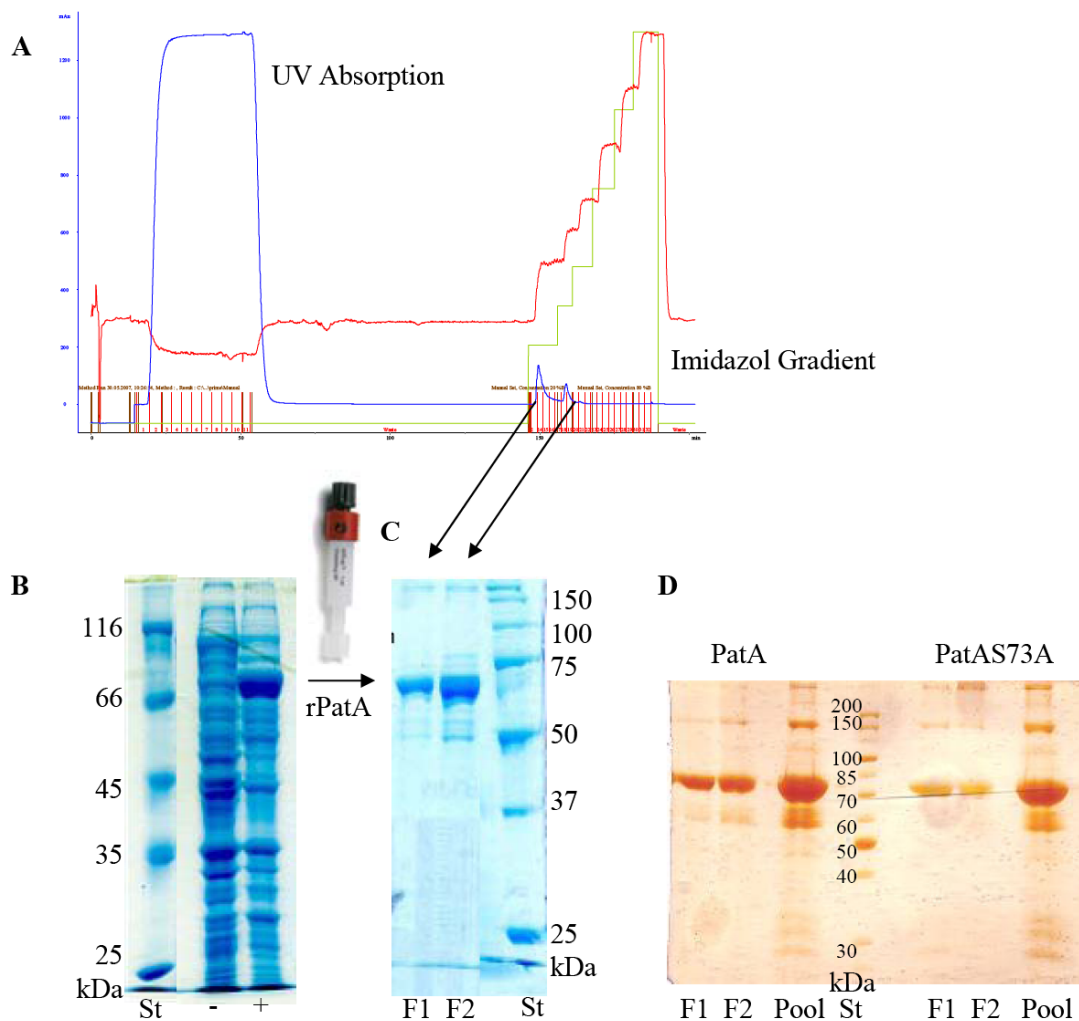


Abb. 4.16 Aufreinigung von rekombinant exprimiertem *L. pneumophila* Philadelphia-1 PatA. (A) Chromatogramm des FPLC Laufs von PatA Expressionsklon-Lysat über eine HisTrap HP Säule. Gebundenes PatA Protein eluierte in zwei Fraktionen. (B) SDS-PAGE von Zellpelletlysaten uninduzierter (-) und induzierter (+) PatA Expressionskultur. (C) SDS-PAGE der zwei eluierten Fraktionen der Chromatographie. B & C zeigen 10% Acrylamidgele gefärbt mit Coomassie blue. (D) Silber gefärbtes Gel von aufgereinigtem PatA und PatAS73A (Je 3µg in F1&2, 15µg in gepoolter Fraktion). F1, F2 = eluierte Fraktionen 1 und 2, St = Protein Standard.

Ergebnisse

Zusätzlich zum PatA Wildtypprotein wurde eine Mutante im aktiven Zentrum der Patatin-Domäne generiert. Hierzu wurde in pPA12 (pET160+*patA*) der Basenpaaraustausch T217G (Thymin gegen Guanin) vorgenommen, was in pPA46 (pET160+*patAT217G*) resultierte. Das auf pPA46 kodierte Protein (PatAS73A) trug somit ein mutiertes Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G, welches in G-X-A-X-G gewandelt wurde. Die Generation der *active site* Mutante war unter mehreren Gesichtspunkten geboten. Für die biochemische Charakterisierung von PatA sowie alle weiteren funktionellen Assays war zunächst ein geeignetes Kontrollprotein zur Verifizierung der Ergebnisse erforderlich. Weiter würde der Vergleich von Wildtyp Protein und der S73A Mutante eine eindeutige Zuordnung der Phospholipaseaktivität zur Patatindomäne des Proteins ermöglichen.

Bei der Aufreinigung eluierte an die Nickel-Affinitätsmatrix gebundenes Wildtypprotein oder das mutierte Protein PatAS73A stets in zwei Schritten (Abb.4.16). Peak 1 eluierte bei 20% Imidazol im Elutionspuffer und der dominante Peak 2 bei 30% Imidazol. Beide FPLC Fraktionen waren von vergleichbarer Reinheit. Da zudem die lipolytische Aktivität äquivalenter Proteinmengen beider Fraktionen identisch war, wurden die beiden Fraktionen für alle weiteren Versuche stets gepoolt eingesetzt.

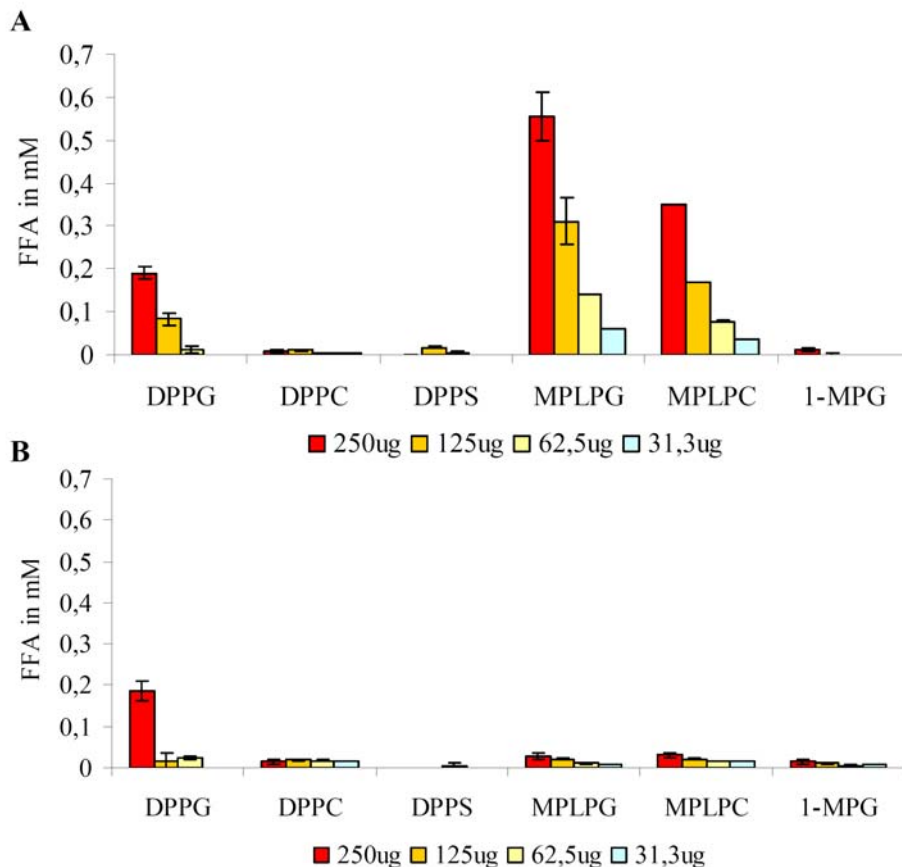


Abb. 4.17 PatA besitzt LPLA und PLA Aktivität. Lipidhydrolyse von *L. pneumophila* PatA (A) und PatAS73A (B) mit den Substraten DPPG, DPPC, DPPS, MPLPG, MPLPC und 1-MPG in 15 Stunden Reaktionszeit. Von beiden Proteinen wurden Proteinkonzentrationen 250, 125, 62,5, 31,3 µg/ml Reaktionsvolumen eingesetzt. Anschliessend wurde die Menge freigesetzter Fettsäuren bestimmt. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte und sind pufferbereinigt (drei Wiederholungen).

Ergebnisse

Die gereinigten Proteine wurden in vier Konzentrationen von 20µg bis 2,5µg je 80µl Reaktionsvolumen eingesetzt. Nach 15h Inkubation wurde die Menge freigesetzter Fettsäuren bestimmt (Abb 4.17). PatA und PatAS73A wurden mit insgesamt fünf verschiedenen Phospholipasesubstraten und einem Lipasesubstrat (1-MPG) inkubiert. Die bevorzugt hydrolysierten Substrate wurden ermittelt. PatA, nicht aber PatAS73A, spaltete vor allem von den Substraten MPLPG und MPLPC Fettsäuren ab. Die Menge freigesetzter Fettsäuren korrelierte dabei mit der Menge eingesetzten Proteins. 250µg/ml Reaktionsvolumen PatA setzten ca. 0,6mM Fettsäuren aus MPLPG und 0,4mM aus MPLPC frei. PatAS73A setzte aus MPLPG und MPLPC keine Fettsäuren frei. PatA besitzt daher vor allem Lysophospholipase A-Aktivität, wobei das bevorzugte Substrat MPLPG war. Zusätzlich hydrolysierte PatA Fettsäurereste vom Phospholipid DPPG (0,3mM FFA). Interessanterweise war diese Glyzero-Phospholipid-spezifische PLA Aktivität vom Aminosäureaustausch im aktiven Zentrum in Abhängigkeit von der im Assay verwendeten Proteindosis betroffen. Von 125µg/ml PatAS73A wurde im Gegensatz zum Wildtypprotein kein DPPG hydrolysiert, wurde dagegen 250µg/ml Protein eingesetzt, war kein Unterschied zwischen PatA und PatAS73A messbar.

4.1.5.1 Lipolytische Aktivität von rekombinant aufgereinigtem *E. coli* RssA und RssAS41A

Neben den hier bearbeiteten *L. pneumophila* PLP wurden das *E. coli* PLP RssA sowie die *active site* Mutante RssAS41A auf lipolytische Aktivität getestet. Das gereinigte Protein wurde vom Labor von Prof. Hengge, FU Berlin, zu Verfügung gestellt.

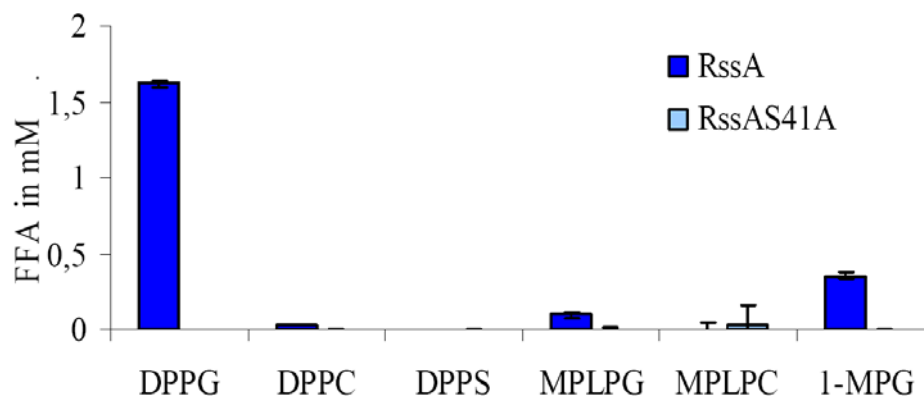


Abb. 4.18 *E. coli* RssA besitzt hauptsächlich PLA Aktivität sowie eine geringere Lipase Aktivität. Lipidhydrolyse von *E. coli* RssA und RssAS41A (24µg/ml Reaktionsvolumen) mit den Substraten DPPG, DPPC, DPPS, MPLPG, MPLPC und 1-MPG für 18 Stunden inkubiert. Anschliessend wurde die Menge freigesetzter Fettsäuren bestimmt. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte und sind pufferbereinigt (drei Wiederholungen).

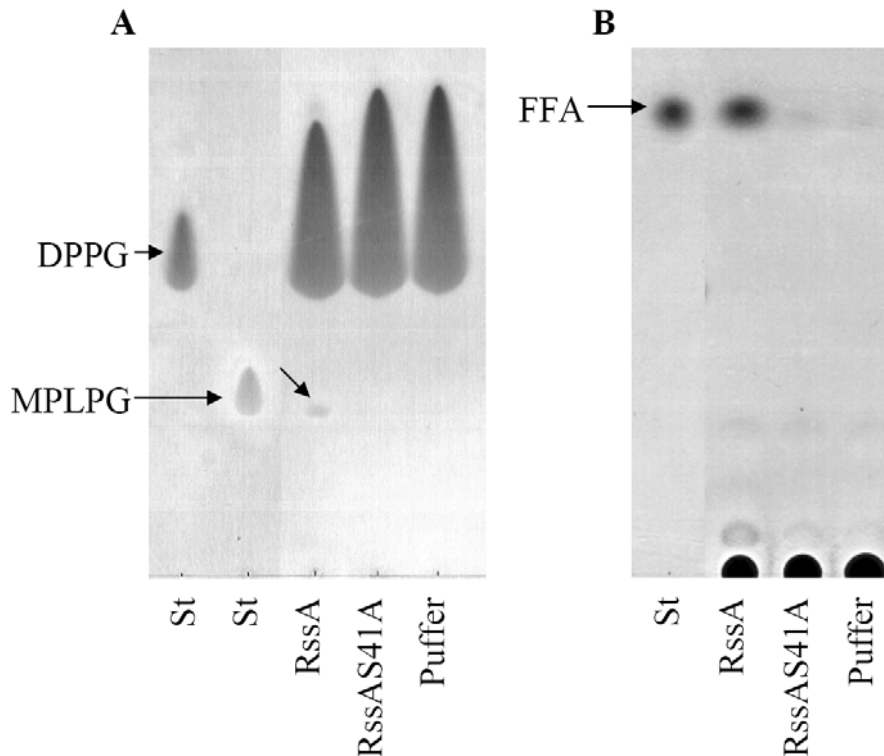


Abb. 4.19 RssA besitzt PLA Aktivität. *E. coli* RssA und RssAS41A (24µg/ml Reaktionsvolumen) wurden für 22h mit dem Hauptsubstrat DPPG inkubiert. Durch polare (A) und apolare (B) Dünnschichtchromatografie wurden die Reaktionsprodukte MPLPG und freie Fettsäuren (FFA) nachgewiesen. Entsprechend verringert sich die Menge DPPG in der Reaktion mit dem Wildtypprotein (A) (zwei Wiederholungen).

Die Abbildungen 4.18 und 4.19 demonstrieren, dass das *E. coli* PLP RssA DPPG spezifische PLA Aktivität sowie (Abb. 4.18) eine schwächere Lipaseaktivität besitzt. Die enzymatische Aktivität wird durch Austausch des katalytisch aktiven Serin 41 gegen Alanin im Lipase-Konsensusmotiv G-X-S-X-G inaktiviert. Die Dünnschichtchromatografie zeigt die entstehenden Reaktionsprodukte bei dem Verdau von DPPG. Es werden MPLPG und freie Fettsäuren generiert, die Menge von DPPG in der Reaktion nimmt ab. 24µg RssA/ml Reaktionsvolumen setzten in 18h Reaktionszeit 1,6mM freie Fettsäuren aus DPPG frei, in der gleichen Zeit wurden von 1-MPG 0,4mM Fettsäureketten abgespalten.

4.1.5.2 Wird PatA durch bakterielle oder wirtszelleigene Faktoren prozessiert?

P. aeruginosa ExoU besitzt nur nach Aktivierung durch die eukaryontische Superoxid Dismutase 1 (SOD1) PLA und LPLA Aktivität, die mit der Zytotoxizität des Proteins korreliert (siehe 2.5.3) (194). Die ausgeprägte Sequenzhomologie von PatA zu ExoU beschränkt sich auf den Bereich der Patatindomänen. Die Phospholipasedomänen von ExoU und PatA befinden sich jeweils am N-Terminus der Proteine. Mutagenesestudien (174), Domainmapping (69) und Suppressorstudien (197) zeigten jedoch, dass auch der ExoU C-Terminus für die zytotoxische Wirkung notwendig ist. Es muss daher ein Zwei-Domänen

Ergebnisse

Konzept des Proteins angenommen werden. Obwohl PatA keine Homologie zur C-terminalen Region von ExoU besitzt, die möglicherweise auch in die Kofaktorbindung involviert ist, war von Interesse, ob die PLA/LPLA Aktivität von PatA bei Präsenz bakterieller oder wirtszelleigener Kofaktoren veränderbar bzw. sogar stimulierbar ist.

Dazu wurde PatA Wildtypprotein und inaktives PatAS73A mit Lysaten der humanen Epithelzelllinie A549- (Abb.4.20) oder *L. pneumophila*- Zelllysaten (Abb.4.21) vorinkubiert und anschliessend die lipolytische Aktivität durch Messung freigesetzter Fettsäuren bestimmt.

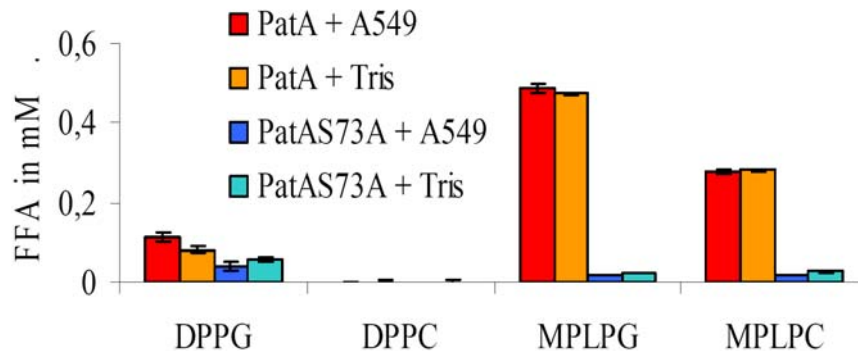


Abb. 4.20 Die Menge freigesetzter Fettsäuren durch PatA bzw. PatAS73A (125µg/ml Reaktionsvolumen) in 19 Stunden Reaktionszeit wird durch Zugabe von A549-Zelllysat nicht verändert. Beide Proteine wurden mit 3,5% (37,5µl A549-Lysat [in Trispuffer]/ml Reaktionsvolumen) bzw. 0% (37,5µl Trispuffer/ml Reaktionsvolumen) A549-Zelllysat inkubiert und in Lipidhydrolysetests mit den Substraten DPPG, DPPC, MPLPG und MPLPC eingesetzt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte (zwei Wiederholungen).

Nach 19 Stunden Reaktionszeit wurden die mit A549 Zelllysat vorinkubiertem und nicht vorinkubiertem Protein freigesetzten Fettsäuren bestimmt. Von PatA Wildtypprotein wurden während 19h Reaktionsdauer 500µM freie Fettsäuren von MPLPG freigesetzt, 300µM von MPLPC und 100µM von DPPG. Die Freisetzung von Fettsäuren aus den Substraten war durch vorinkubiertes PatA und nicht vorinkubiertes Enzym identisch. Genauso verhielt es sich bei PatAS73A, wo unabhängig von der Präsenz des Zelllysates keine Lipidhydrolyse von den Lysophospholipid-Substraten erfolgte. Das PatA Substratspektrum und die lipolytische Aktivität wurden durch Präinkubation mit A549 Zelllysat nicht verändert (Abb. 4.20). PatA besitzt LPLA Aktivität gegenüber MPLPG und MPLPC sowie PLA Aktivität gegenüber DPPG.

Bakterielle Enzyme können von bakteriellen Faktoren posttranslationale Modifikationen erfahren, die sich auf deren enzymatische Charakteristika auswirken können (16). Deshalb wurde getestet, ob die Gegenwart *Legionella*-spezifischer Faktoren zur Modifizierung der enzymatischen Aktivität von PatA führt. PatA wurde mit *L. pneumophila* Philadelphia-1 Zelllysaten vorinkubiert und die lipolytische Aktivität bestimmt (Abb. 4.21). Als Kontrolle

Ergebnisse

wurde die PatAS73A Mutante mitgeführt. Diese besitzt ein mutiertes aktives Zentrum und ist daher katalytisch inaktiv. Deshalb sollte sich durch Kofaktorbindung oder Prozessierung keine Aktivierung einstellen.

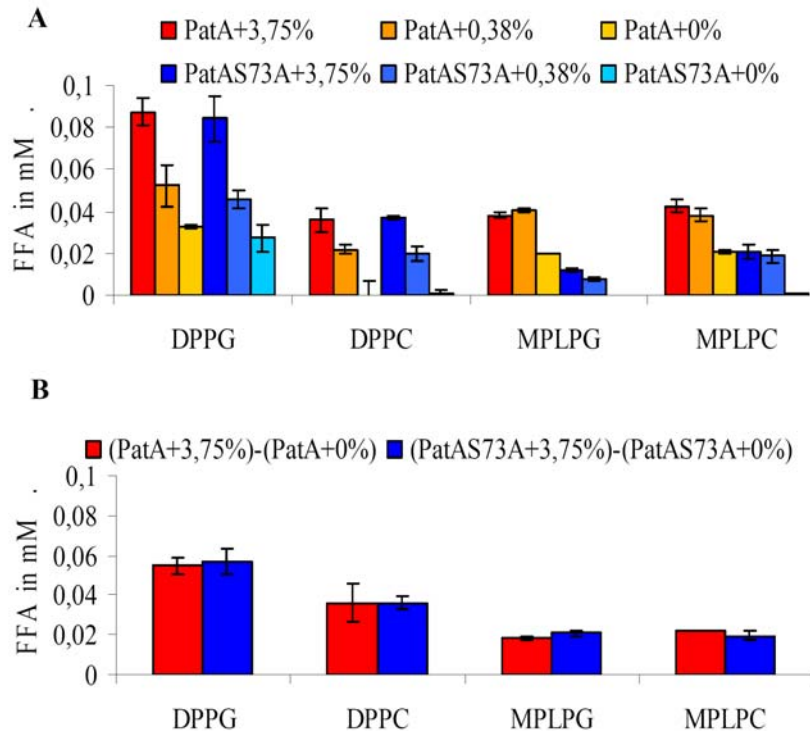


Abb. 4.21 Die Lipidhydrolyse durch PatA bzw. PatAS73A (125µg/ml Reaktionsvolumen) in 1,5 Stunden Reaktionszeit wird durch Zugabe von *L. pneumophila* Philadelphia-1 Zelllysate nicht verändert. Beide Proteine wurden mit 3,75% (37,5µl Lysat[in Trispuffer]/ml Reaktionsvolumen), 0,38% und 0% (3,75µl Trispuffer/ml Reaktionsvolumen) Bakterien-Zelllysate inkubiert und in Lipidhydrolysetests mit den Substraten DPPG, DPPC, MPLPG und MPLPC eingesetzt. A: Lipidhydrolyse von PatA (und PatAS73A) Bakterienlysate. B: Differenzen von PatA (bzw. PatAS73A) +3,75% und PatA (bzw. PatAS73A) +0% Bakterienlysate. Die Daten repräsentieren Doppelwerte und sind pufferbereinigt (zwei Wiederholungen).

Es zeigte sich, dass sich die lipolytische Aktivität sowohl von PatA als auch PatAS73A, je nachdem welche Menge Zelllysate zugesetzt wurde, im Vergleich zu den Kontrollreaktionen, in denen Tris Puffer zugesetzt wurde, erhöhte (Abb.4.21). In allen drei Ansätzen, PatA, PatAS73A und der Tris Kontrolle erhöhte sich die lipolytische Aktivität gegenüber allen verwendeten Substraten nach 3 Stunden Reaktionszeit um etwa das zwei- bis dreifache. Abbildung 4.21B zeigt die relative Erhöhung der lipolytischen Aktivität der *active site* Mutante und dem Wildtypprotein als Differenz der Einzelwerte beider eingesetzten Enzyme abzüglich der Kontrollreaktionen, die ohne Bakterienlysate inkubiert wurden. Unabhängig vom Substrat zeigte sich sowohl beim Wildtypprotein als auch bei der Mutante der gleiche Nettozuwachs freigesetzter Fettsäuren. Da sich weder der relative Zuwachs freigesetzter Fettsäuren noch das Substratspektrum der eingesetzten Proteine (Wildtyp oder Mutante) durch Zugabe von bakteriellem Zelllysate veränderte, konnte unter den gewählten

Ergebnisse

Bedingungen keine Modifizierung der enzymatischen Aktivität von PatA bzw. PatAS73A festgestellt werden.

4.1.5.3 Zytotoxizität von rekombinant aufgereinigtem PatA

Phospholipasen sind in der Lage, biologische Membranen zu beschädigen. Diese Eigenschaft verleiht ihnen zytotoxische Eigenschaften (73). Da PatA phospholipolytische Aktivität besitzt, wurde untersucht, ob die Zugabe von PatA die Vitalität von Wirtszellen, z.B. Makrophagen beeinflusst. PatA wird während der Legionelleninfektion in die Wirtszelle injiziert (211,228). Das ins Kulturmedium zugegebene Protein könnte jedoch zum Beispiel über Nahrungsvakuolen in das Innere der Zellen gelangen und dort seine mögliche zytotoxische Wirkung entfalten. Die für 2,5 Stunden mit PatA Protein inkubierten U937 Makrophagen wurden nach einer Reaktionszeit als Lysat der SDS PAGE und Western Blot Analyse (Abb. 4.23), sowie einer Alamar Blue Vitalfärbung unterzogen (Abb. 4.22). Die Reduktion des Alamar Blue Farbstoffs erfolgt durch stoffwechselaktive (vitale) Zellen, daher lässt der Vergleich der Reduktion des Indikatorfarbstoffs einen Vergleich der Vitalität der Zellen zu.

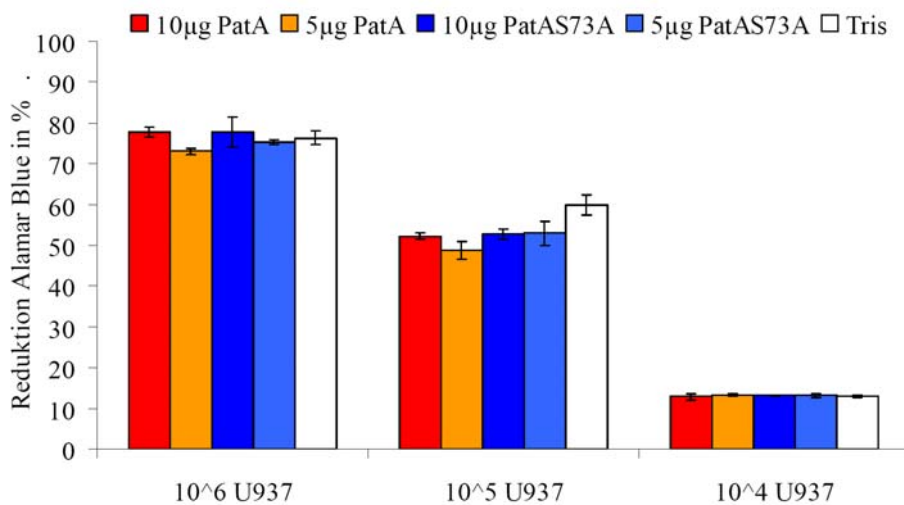


Abb. 4.22 Die Vitalität von U937 Makrophagen wurde durch Zugabe von PatA/PatAS73A in das Kulturmedium nicht reduziert. 10⁶, 10⁵ und 10⁴ U937 Makrophagen wurden für 2,5 Stunden mit den Proteinproben (10 oder 5µg) bzw. einer Trispuffer Kontrolle inkubiert und die Menge reduzierten Alamar Blue-Farbstoffs gemessen. Mehr Reduktion lässt auf mehr Stoffwechselaktivität und Vitalität einer äquivalenten Zellzahl schließen. Das Gesamtreaktionsvolumen betrug 110µl. Die Daten repräsentieren Dreifachwerte.

Die Vitalfärbung der mit PatA bzw. PatAS73A inkubierten U937 Zellen zeigte, dass die Präsenz von PatA oder PatAS73A in den Zellkulturen zu keiner veränderten Reduktion des Alamar Blue Farbstoffes im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Proteinzugabe führte. Die Zellen wurden von PatA oder PatAS73A demnach nicht in ihrer Vitalität beschädigt, es konnte also keine zytotoxische Wirkung festgestellt werden.

Ergebnisse

4.1.6 Lokalisation von PatA in Wirtszellen

Wegen fehlender Sequenzhomologien, die Hinweise auf die (intra-)zelluläre Lokalisation von PatA nach dessen Sekretion durch *L. pneumophila* Philadelphia-1 in den extrabakteriellen Raum oder dessen Injektion in die Wirtszelle geben könnten, wurde untersucht, ob es ein spezifisches zelluläres Ziel von PatA gibt. Da PatA Phospholipaseaktivität besitzt, liegt nahe, dass sich die Aktivität des Proteins auf zelluläre Phospholipide konzentrieren könnte, die in Membranen lokalisiert sind. Deshalb wurde untersucht, ob sich äusserlich zugegebenes PatA Protein nach Zellaufschluss in der Membranfraktion der Zellen oder in der löslichen Fraktion befindet (Abb. 4.23).

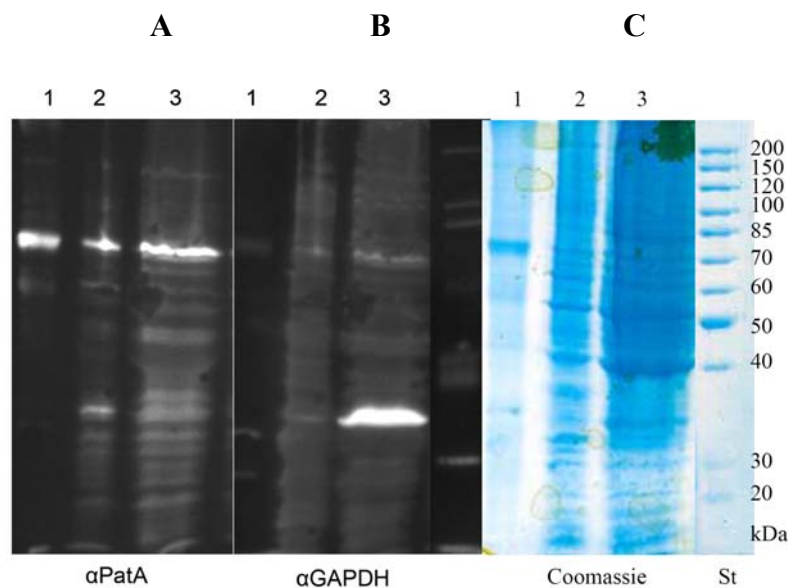


Abb. 4.23 PatA ist nach Zugabe zu U937 Makrophagen in der unlöslichen Zellfraktion nachweisbar. Lösliche und unlösliche Fraktionen von lysierten U937 Makrophagen, welche vorher 4h mit PatA inkubiert worden waren, wurden im Western Blot untersucht. Spur 1=4μl Lysat eines *E.coli* PatA Expressionsklonlysates (=Blot- und Antikörperkontrolle), Spur 2=unlösliche Fraktion des Makrophagenlysates, Spur 3=lösliche Fraktion des Makrophagenlysates. A: Western Blot mit anti-PatA B: Western Blot mit anti-GAPDH (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) Antikörpern. C: Coomassie gefärbtes SDS PAGE Gel. Die aufgetragene Proteinmenge der löslichen Fraktion überstieg die der unlöslichen Fraktion stark (ca. 5-fach). Der Zytoplasmamarker GAPDH befand sich ausschliesslich in der löslichen Fraktion (B). PatA existierte in beiden Fraktionen. Verglichen mit der eingesetzten Gesamtproteinmenge beider Fraktionen befindet sich ein grösserer Anteil von PatA-Protein in der unlöslichen Fraktion (Membranfraktion). St=Proteinstandard (zwei Wiederholungen).

Das dem Zellkulturansatz zugegebene PatA Protein mit N-terminalem His₆ Tag ist nach 4 Stunden Inkubationszeit und anschliessendem dreimaligen Waschen der Zellen in der unlöslichen und der löslichen Fraktion der U937 Zellextrakte nachweisbar. Daraus folgt: obwohl die äusserliche Zugabe von PatA zu U937 Makrophagen keine messbaren zytotoxischen Effekte auf die Makrophagen hatte (siehe 4.1.5.3), waren Teilmengen des zugegebenen Proteins nach 4 Stunden Inkubationszeit in der Membranfraktion verankert.

Ergebnisse

Diese Ergebnis unterstreicht die Hypothese, dass sich der zelluläre Wirkort der PatA-Aktivität an Phospholipidmembranen befindet.

4.1.6.1 Lokalisation von PatA in transfizierten Epithelzellen

Die Arbeiten von Shohdy *et al.* sowie VanRheenen *et al.* zeigen, dass die C-terminale Region von PatA für dessen Translokation vom Bakterium in die Wirtszelle sowie für den von PatA verursachten *vps*- (*vacuolar protein sorting*) Phänotyp in Hefe (siehe 2.5.5) kritisch ist (211,228). Ein zelluläres Ziel von PatA wurde in diesen Berichten nicht identifiziert. Obwohl die C-Termini von *L. pneumophila* PatA und *P. aeruginosa* ExoU keine signifikanten Proteinsequenzhomologien aufweisen, werden in der wichtigen Rolle der C-Termini für die Differenzierung der jeweiligen Phänotypen mögliche funktionelle Gemeinsamkeiten beider Proteine offenbar (ExoU – starke Zytotoxizität (174); PatA - *vps*- Phänotyp (211)).

Deshalb soll im folgenden die intrazelluläre Lokalisation von PatA sowie die Rolle des C-Terminus für die Lokalisation geklärt werden. Es wurden also zunächst im Plasmid pEGFP-C2, welches die Expression von N-terminal fusionierten GFP Fusionsproteinen in Säugerzellen erlaubt, zwei Konstrukte generiert: pPA54 kodierte GFP, N-terminal an das Gesamtprotein PatA fusioniert (GFP-PatA), und pPA56 kodierte GFP, N-terminal an die verkürzte Version von PatA, welcher der C-Terminus (15kDa) fehlte (PatAK492Stop) (Abb. 4.24).

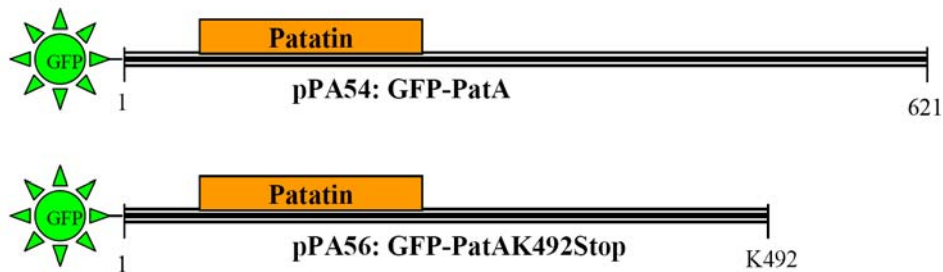


Abb. 4.24 pPA54 und pPA56 kodieren das PatA Wildtypprotein bzw. die verkürzte Version PatAK492Stop mit N-terminal verknüpftem GFP Protein (95 bzw. 80kDa). Orange Balken zeigen die Lage der Patatin-Domänen.

Transient transfizierte humane A549 Lungenepithelzellen, die *L. pneumophila* Philadelphia-1 PatA (pPA54) und PatAK492Stop (pPA56) exprimierten (Abb. 4.25A), wurden in fixiertem Zustand mikroskopisch untersucht. Als Transfektionskontrolle wurde der Leervektor, pEGFP-C2 mitgeführt (Abb. 4.25B). Ko-Lokalisationsstudien mit E-Cadherin zeigten eine enge Assoziation von PatA mit der Zytoplasmamembran (Abb. 4.26).

Ergebnisse

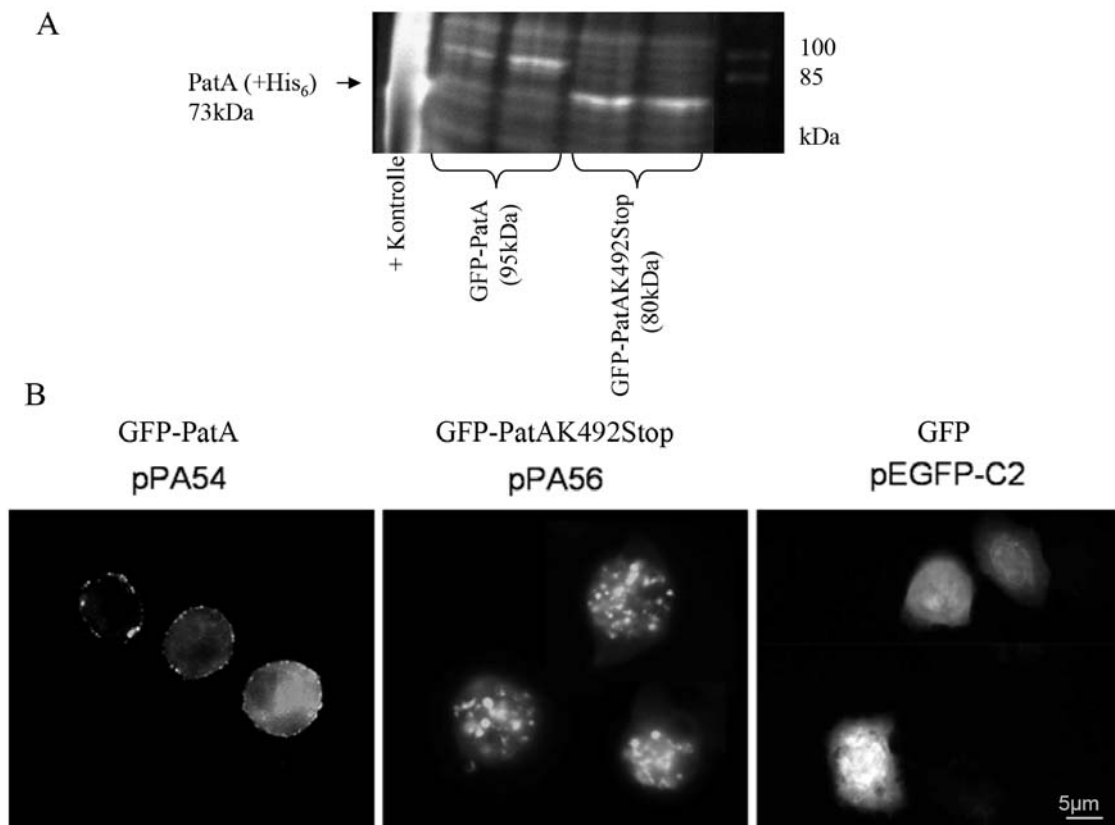


Abb. 4.25 GFP-PatA ist in transfizierten A549 Epithelzellen an der Zellperipherie lokalisiert, GFP-PatAK492Stop ist zytoplasmatisch und aggregiert lokalisiert. (A) Western Blot von GFP-PatA und GFP-PatAK492Stop mit polyklonalen PatA-spezifischen Antikörpern. (B) Lokalisation von GFP-PatA in A549 Zellen. Die meisten Zellen, die GFP-PatA oder GFP-PatAK492Stop exprimieren, sind abgerundet. Zellen, die GFP exprimieren, sind überwiegend nicht abgerundet, GFP ist zytoplasmatisch in den Zellen lokalisiert (3 Wiederholungen).

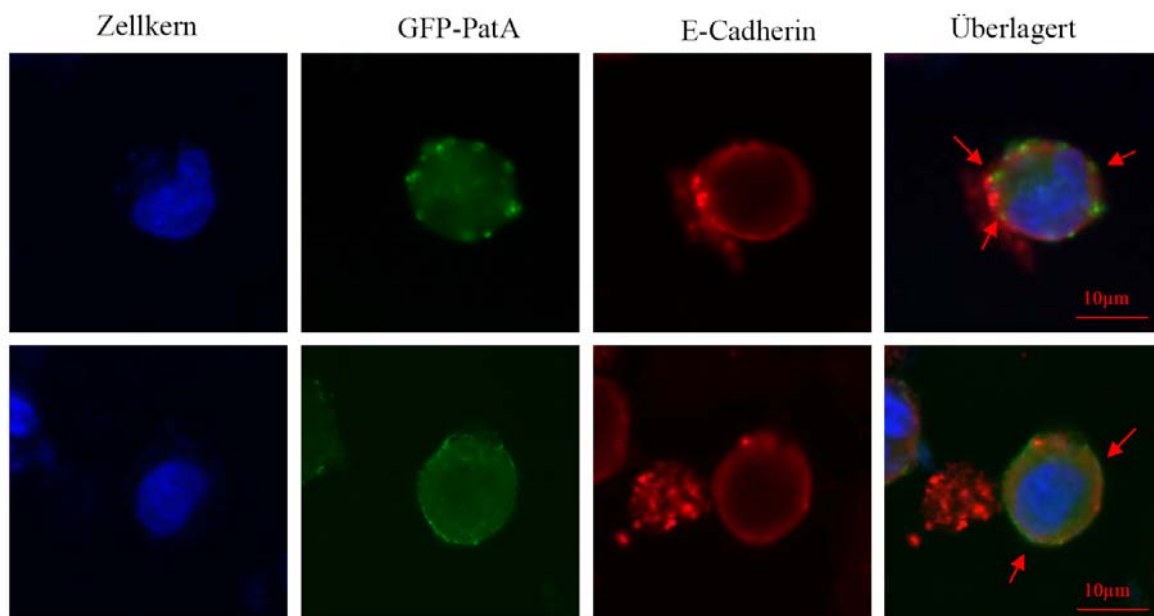


Abb. 4.26 GFP-PatA ist in transfizierten A549 Epithelzellen an der Zellperipherie in enger Assoziation mit E-Cadherin lokalisiert. Die Zellkerne wurden mit DAPI gefärbt (blau), E-Cadherin wurde mit Cadherin spezifischen Primärantikörpern und anschliessend mit AlexaFluor 594 (rot) konjugierten Sekundärantikörpern markiert (3 Wiederholungen).

Ergebnisse

Abb. 4.25 bis 4.27 zeigen deutlich, dass GFP-PatA an der Zellperipherie lokalisiert ist. PatA befindet sich in der Zellperipherie in enger Assoziation mit E-Cadherin (Abb. 4.26), einem Zelladhäsionsmolekül welches in der Zytoplasmamembran eukaryontischer (u.a.) Epithelzellen verankert ist. Die verkürzte PatA Variante, der 129 C-terminale Aminosäuren fehlen, befindet sich dagegen nicht in oder an der Zytoplasmamembran. GFP-exprimierende Kontrollzellen zeigen die für Epithelkulturzellen charakteristische, längliche Gestalt (Abb. 4.25). In Abbildung 4.27 sind konfokale Aufnahmen der Zellen, die pPA54 bzw. pPA56 exprimieren, sowie rekonstruierte Z-Schnitte dieser Zellen zu sehen. Die membranständige Lokalisation von GFP-PatA geht aus dieser Darstellung, die verschiedene Fokusebenen berücksichtigt, deutlich hervor. Im Gegensatz dazu ist zu erkennen das sich die granulösen Strukturen von GFP-PatAK492Stop nicht mehr in der Zellperipherie, sondern im Zellinneren befinden (Abb. 4.27)

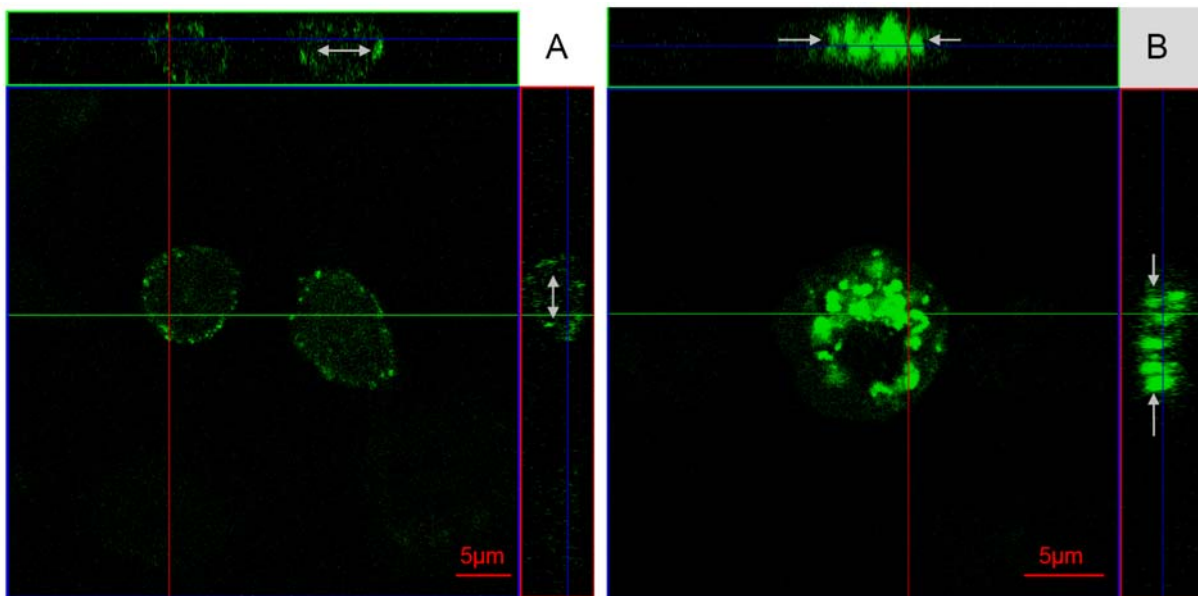


Abb. 4.27 In A549 Lungenepithelzellen exprimiertes GFP-PatA Protein (pPA54) ist in der Zellperipherie lokalisiert (A), GFP-PatAK492Stop Protein (pPA56) ist im Zellinneren in granulösen Strukturen lokalisiert (B). Weiße Pfeile in der Z-Ebene zeigen die periphere (A) oder zentrale (B) Lokalisation des grünen Fluoreszenzsignals (drei Wiederholungen).

Um zu prüfen, ob der Verlust der peripheren Lokalisation von GFP-PatA tatsächlich ausschliesslich auf das Fehlen des C-Terminus sowie einer darauf eventuell vorhandenen Signalsequenz / „Targetingsequenz“ zurückzuführen ist, wurde ein Fusionskonstrukt generiert, welches eine GFP-Fusion mit dem PatA C-Terminus kodiert. Dazu wurden die terminalen 129 Aminosäuren (fehlen in PatAK492Stop) in pEGFP-C2 kloniert und das Fusionsprotein GFP-PatACTerminus in A549-Zellen exprimiert (Abb. 4.28).

Ergebnisse

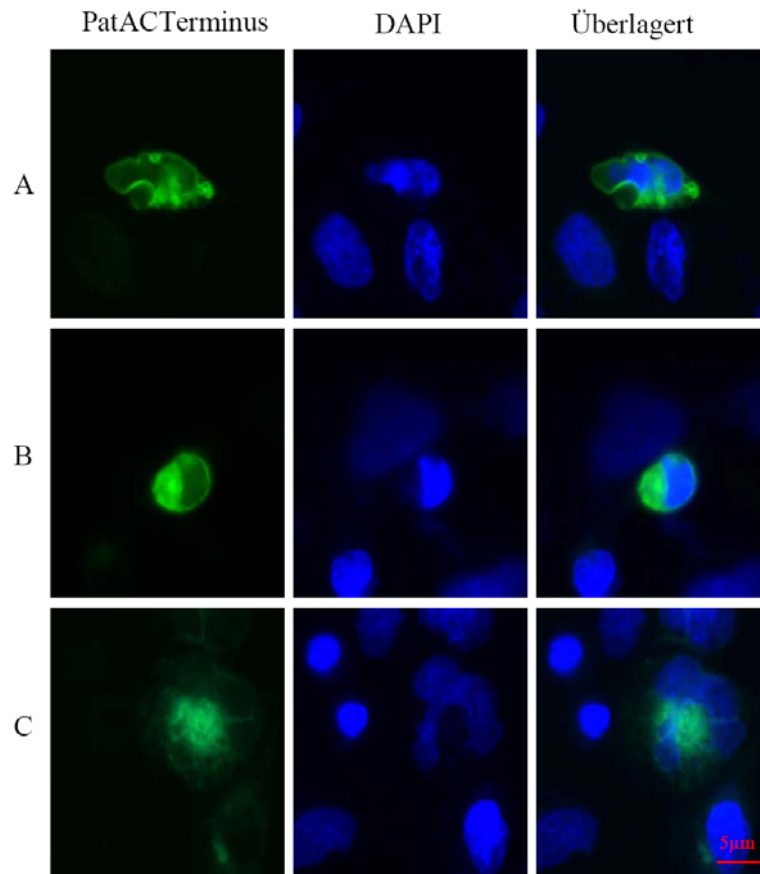


Abb. 4.28 A549 Zellen, die GFP-PatACTerminus exprimieren (pPA65) sind im Zelltod begriffen. Die Zellkerne pPA65 exprimierender Zellen sind kondensiert (A&B) oder ausgewaschen (C), die Zellen selbst sind abgerundet oder aufgebläht und erscheinen insgesamt unphysiologisch. Die diskrete, punktierte Lokalisation des GFP-Fusionsproteins in der Zellperipherie, die das GFP-PatA Fusionsprotein zeigte (Abb. 4.25 bis 4.27, 4.29) ist hier nicht zu erkennen (zwei Wiederholungen).

In der Studie von Shohdy *et al.* (2005) wurde gezeigt, dass der C-terminale Teil des PatA-Proteins in Hefe exprimiert, einen wesentlich ausgeprägteren *vps*- Phänotyp verursachte als das Gesamtprotein (211). In Abbildung 4.28 ist zu sehen, dass das Signalmuster von GFP-PatACTerminus in A549 Zellen nicht mit dem Signalmuster, welches beim vollständigen Wildtypprotein zu detektieren ist, übereinstimmt. Obwohl sich das verkürzte PatA Protein tendenziell auch in der Zellperipherie und eventuell membranständig befindet, sind auch zytoplasmatisch lokalisierte Fluoreszenzsignale zu sehen. Weiterhin sind die Fluoreszenzsignale nicht punktiert lokalisiert, sondern homogen an der Peripherie und auch im Zytoplasma verteilt. Interessanterweise befinden sich die Zellen, welche pPA65 (GFP-PatACTerminus) exprimieren, in einem schlechten physiologischen Zustand. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass die Expression der C-terminalen 129 Aminosäuren des PatA Proteins zellschädigende Effekte verursacht, was die Ergebnisse von Shohdy *et al.* (2005) bestätigt.

Insgesamt war die Signalstärke, d.h. die Proteinmenge von GFP-PatA (pPA54) in den Zellen niedriger als bei Zellen, die GFP-PatAK492Stop (pPA56) exprimierten. Da PatA zytotoxische

Ergebnisse

Eigenschaften besitzt (228), war anzunehmen, dass die transfizierten Zellen nur geringe Mengen PatA-Protein tolerieren und bei Überschreitung dieser Menge geschädigt werden. Um zu prüfen, ob dies der phospholipolytischen Aktivität von PatA geschuldet sein könnte, wurde eine mutierte, katalytisch inaktive Variante von PatA, PatAS73A (siehe 4.1.5) in A549 Zellen exprimiert und Signalstärke sowie Verteilung verglichen (Abb. 4.29).

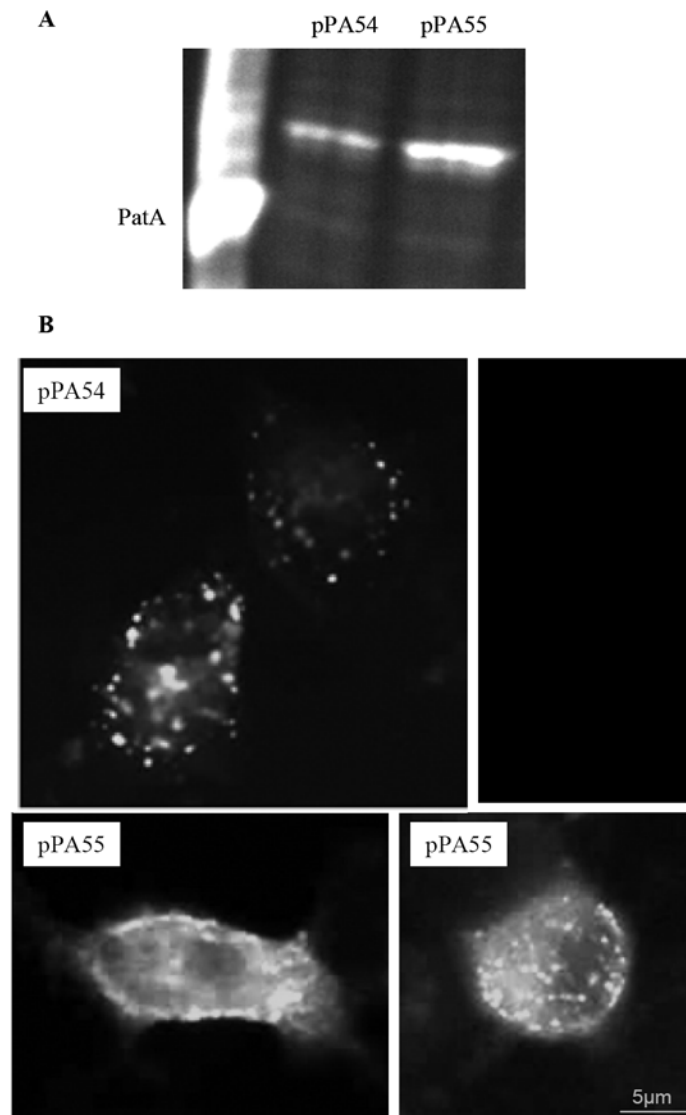


Abb. 4.29 GFP-PatA und GFP-PatAS73A zeigten periphere intrazelluläre Lokalisation. (A) Quantitativer Western Blot von Zelllysaten [die aus äquivalenten Zellmengen gewonnen wurden] von A549(pPA54) (GFP-PatA) und A549(pPA55) (GFP-PatAS73A). Zellen, die pPA55 exprimierten enthielten mehr GFP-Fusionsprotein. (B) GFP-PatA (pPA54) zeigt eine punktuelle Lokalisation in der Zellperipherie. Die Menge von Fusionsprotein bei Zellen die GFP-PatAS73A (pPA55) exprimieren ist grösser als bei pPA54. Dennoch sind Fluoreszenzsignale an der Zellperipherie lokalisiert (drei Wiederholungen).

Abb. 4.29 zeigt, dass Zellen, die GFP-PatAS73A exprimierten, mehr Protein enthielten als solche die GFP fusioniert an das Wildtypprotein exprimierten. Das war auch im Western Blot

Ergebnisse

nachzuvollziehen. Obgleich die höhere Signalstärke eine diskrete Zuordnung der Signalherkunft beeinträchtigte, war doch klar zu erkennen, dass sich die Regionen der höchsten Signalintensität an der Zellperipherie befanden.

4.1.6.2 Lokalisation von PatA in *L. pneumophila* und in infizierten Wirtszellen

Um PatA in infizierten Wirtszellen zu lokalisieren, wurden zwei Strategien verfolgt: (1.) die Detektion von PatA durch fluoreszierende GFP Fusionsproteine und (2.) der Proteinnachweis mit PatA-spezifischen Antikörpern. Zunächst wurden die Plasmide pPA40 und pPA44 generiert, die C-, bzw. N-terminale GFP-PatA Fusionsproteine kodieren. Die Konstrukte wurden in *L. pneumophila* eingebracht und im Western Blot Expressionskontrollen durchgeführt (Abb.4.30, Abb. 4.31).

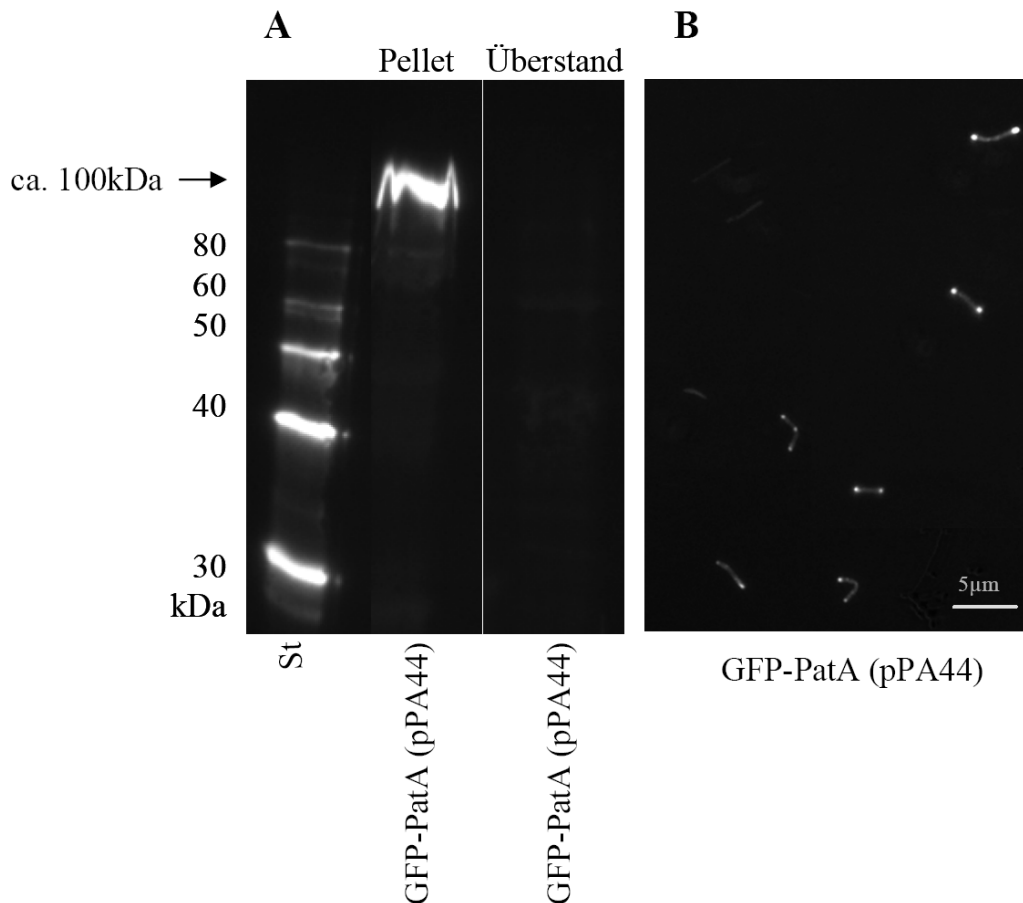


Abb. 4.30 GFP-PatA (N-terminale GFP Fusion) ist polar an *L. pneumophila* lokalisiert. (A) Western Blot, Bakterienmaterial aus der stationären Wachstumsphase wurde in SDS Probenpuffer lysiert und mit GFP spezifischen Antikörpern beprobt. Das Molekulargewicht des Fusionsproteins beträgt ca. 100kDa (PatA=69kDa+GFP=27kDa). Im gefällten und 50-fach konzentrierten Kulturüberstand war kein GFP-PatA Protein nachweisbar. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* Philadelphia-1 (pPA44=pBCKS+*gfp*+*patA*). Bakterienmaterial aus der stationären Phase wurde fixiert und mikroskopisch begutachtet. Das GFP Fluoreszenzsignal ist polar am/im Bakterienkörper lokalisiert.

Ergebnisse

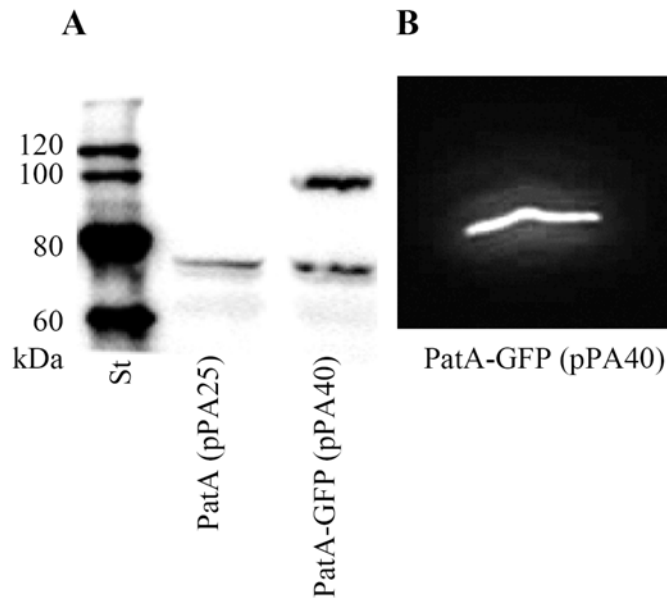


Abb. 4.31 PatA-GFP (C-terminale GFP Fusion) ist homogen am/im Bakterium lokalisiert. (A) Western Blot mit PatA spezifischen Antikörpern von *E. coli* Zellpelletlysaten, die pPA25 (pBCKS+*patA*) und pPA40 (pBCKS+*patA*+*gfp*) exprimieren. PatA-GFP erscheint als Fusionsprotein mit der entsprechenden Verschiebung im Molekulargewicht. Zusätzlich erscheint eine Bande auf Wildtypniveau. (B) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von *L. pneumophila* Philadelphia-1(pPA40) (pBCKS+*patA*+*gfp*). Bakterienmaterial aus der stationären Phase wurde fixiert und mikroskopisch begutachtet. Das GFP Fluoreszenzsignal ist homogen am/im Bakterienkörper lokalisiert.

Um von *L. pneumophila* in infizierte Wirtszellen injiziertes PatA-Protein nachzuweisen, wurden Antikörper in Hühnchen (polyklonal), sowie in Mäusen (monoklonal via Hybridoma-Technik) generiert und für Immunfluoreszenzfärbungen eingesetzt. Mit keiner der erzeugten Antikörpervarianten konnte in der Immunfluoreszenzmikroskopie in Wirtszellen injiziertes PatA Protein nachgewiesen werden. Die Signale waren entweder unspezifisch, d.h. auch bei Infektionen mit *L. pneumophila patA* Mutanten oder uninfizierten Zellen sichtbar (polyklonale Antikörper aus dem Huhn) oder überhaupt nicht sichtbar wie im Falle der monoklonalen Antikörper. Von Legionellen generiertes und in Wirtszellen injiziertes PatA konnte weder zu frühen noch zu späten Infektionszeitpunkten in Wirtszellen detektiert werden. Spezifische Signale waren ausschliesslich assoziiert an die Bakterienzelle und mit polyklonalen Hühnchen-anti-PatA Antikörpern nachweisbar (Abb. 4.32).

Aufgrund der unbefriedigenden Ergebnisse mit den drei generierten Antikörpertypen in der Immunfluoreszenzmikroskopie mit infizierten Wirtszellen, konnte eine spezifische intrazelluläre Lokalisation von durch *L. pneumophila* sekretiertes PatA in Wirtszellen nicht detektiert werden.

Ergebnisse

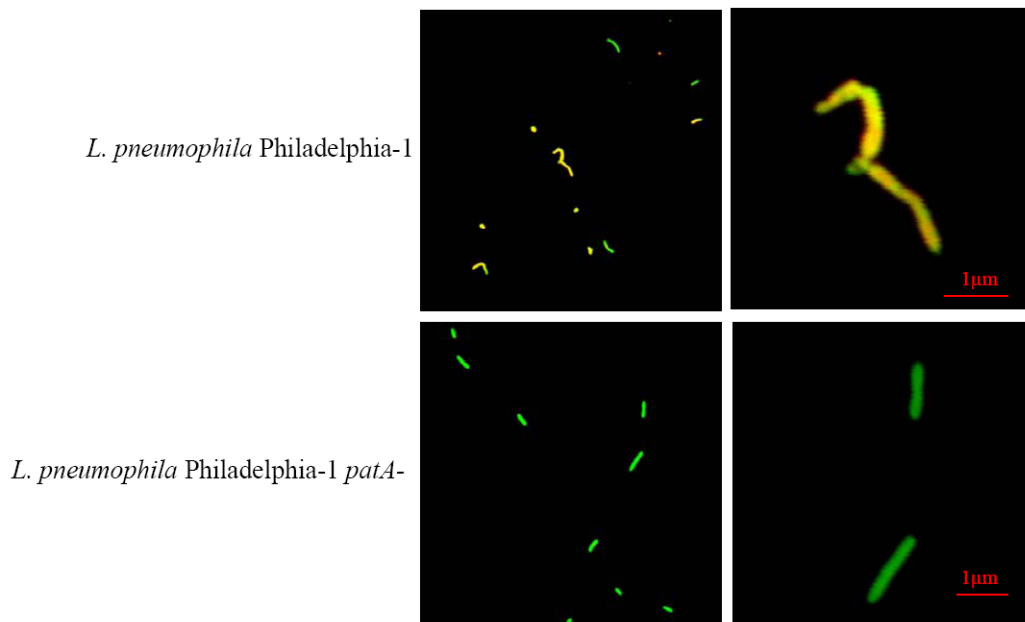


Abb. 4.32 PatA ist zellassoziiert an *L. pneumophila* mit polyklonalen Hühnchen-anti-PatA Antikörpern detektierbar. Grün: Anti-*Legionella* (AlexaFluor488) Rot: Anti-PatA (AlexaFluor568). Roter und grüner Kanal sind überlagert dargestellt. PatA befindet sich zellassoziiert an/in *L. pneumophila* Philadelphia-1 (daher gelbe Signale), bei *L. pneumophila patA* Mutanten war kein Fluoreszenzsignal detektierbar (grün).

4.2 Suche und Identifizierung neuer *Legionella* Gene für die Wirtszellkolonisation

4.2.1 Beobachtungen zum *Scatter* Phänotyp

Bei den Arbeiten an avirulenten *L. pneumophila patA* Mutanten wurde beobachtet, dass diese im Gegensatz zu den virulenten Wildtypbakterien eine ungewöhnliche Koloniemorphologie entwickelten. Diese trat nur dann auf, wenn die Bakterien gemeinsam mit *A. castellanii* Amöben auf BCYE Agar ausgebracht wurden. Die Agarplatten wurden dabei wie üblich für 3 Tage im Brutschrank (37°C) bebrütet und anschliessend bis zum Auszählen der Kolonien bei Raumtemperatur aufbewahrt. Die Kolonien der avirulenten *patA* Mutante zeichneten sich nach 2 bis 3 Tagen Lagerung bei Raumtemperatur (22°C) durch einen Ring von rauer, mattglänzender Oberfläche aus. Der Durchmesser dieses Rings war mit der Zeit zunehmend wobei die Bakterienkoloniegröße abnahm. Nach fünf bis sieben Tagen waren die *Legionella* Kolonien der apathogenen *patA* Mutante vollständig vom Agar „verschwunden“, wobei die Kolonien der Wildtypbakterien unverändert aussahen. Die mikroskopische Untersuchung der Bakterienkolonien zeigte, dass der raue, mattglänzende Ring, welcher ausschliesslich die apathogenen *L. pneumophila* Kolonien umgab, aus Amöben bestand, die die Bakterienkolonie allmählich dezimierten. Aus diesem Grund wurden Bakterienkolonien, die von einem Ring umgeben waren, als „amöbensensitiv“ bezeichnet. Die amöbensensitiven Kolonien, welche

Ergebnisse

sowohl von einem Ring umgeben als auch von Amöben durchsetzt waren, wurden in Anlehnung an ihr äusseres Erscheinungsbild „Scatterkolonien“ genannt (Abb. 4.33). Die *L. pneumophila* Wildtypbakterien, die keine Scatterkolonien ausbildeten, wurden als „amöbenresistente“ Bakterien bezeichnet.

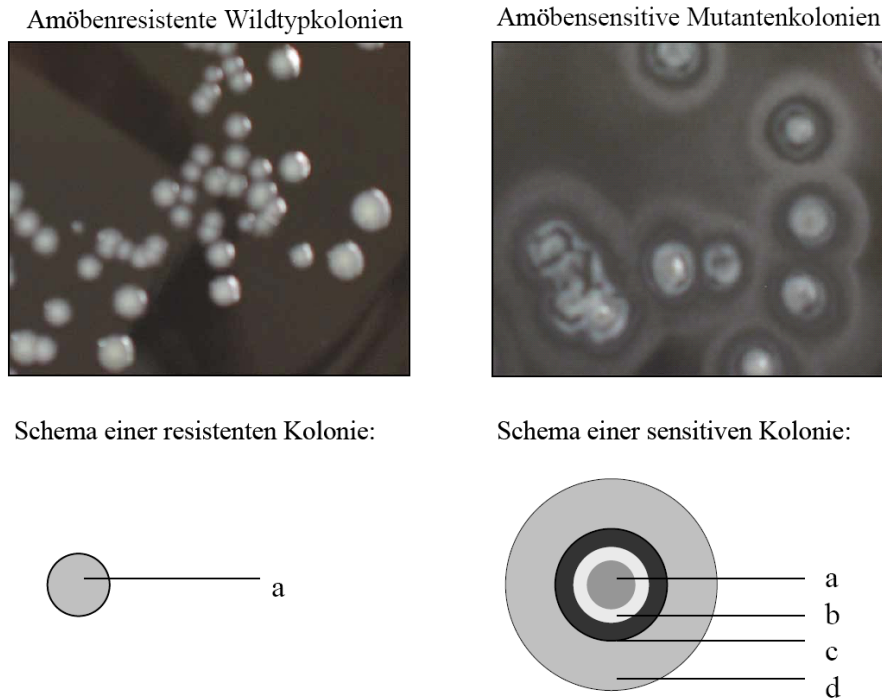


Abb. 4.33 Amöbensensitive Kolonien avirulenter *L. pneumophila* Philadelphia-1 Mutanten weisen 4 unterschiedliche Kolonieregionen auf, amöbenresistente Wildtypkolonien weisen nur eine Region auf. Die Abbildung zeigt Fotografien und Schemata der *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtypkolonien auf BCYE Agar (links) sowie Kolonien von apathogenen *L. pneumophila* Mutanten (rechts). Die Scatterkolonien der apathogenen Mutanten bilden drei diskrete Ringregionen (Ringregionen b bis d) aus, die das Koloniezentrum (Region a) umgeben und sich mit der Zeit ausbreiten.

Die Abb. 4.33 zeigt Fotografien von amöbenresistenten und amöbensensitiven *L. pneumophila* Bakterien. Offensichtlich ist der mattglänzende Ring, der das Zentrum der amöbensensitiven Bakterienkolonien umgibt, aus drei diskreten Ringregionen aufgebaut, die im folgenden detaillierter betrachtet werden sollen. Um die resultierenden vier Regionen detaillierter darstellen zu können, wurden die fraglichen Koloniebereiche für Rasterelektronenmikroskopische (REM) Aufnahmen präpariert. Dazu wurden Agarplatten mit Fixativ überschichtet, auf denen sich Scatterkolonien und „nicht“-Scatterkolonien befanden. Nach Waschschritten und kritischer Punkt-Trocknung erfolgte eine Begutachtung im Rasterelektronenmikroskop (REM). Die Aufarbeitung der Proben war wegen der Labilität der differenzierten Koloniemorphologie auf dem Nähragar schwierig zu bewerkstelligen. Trotzdem konnten nach Optimierung des Protokolls akzeptable Aufnahmen gemacht werden (Abb. 4.34, 4.35).

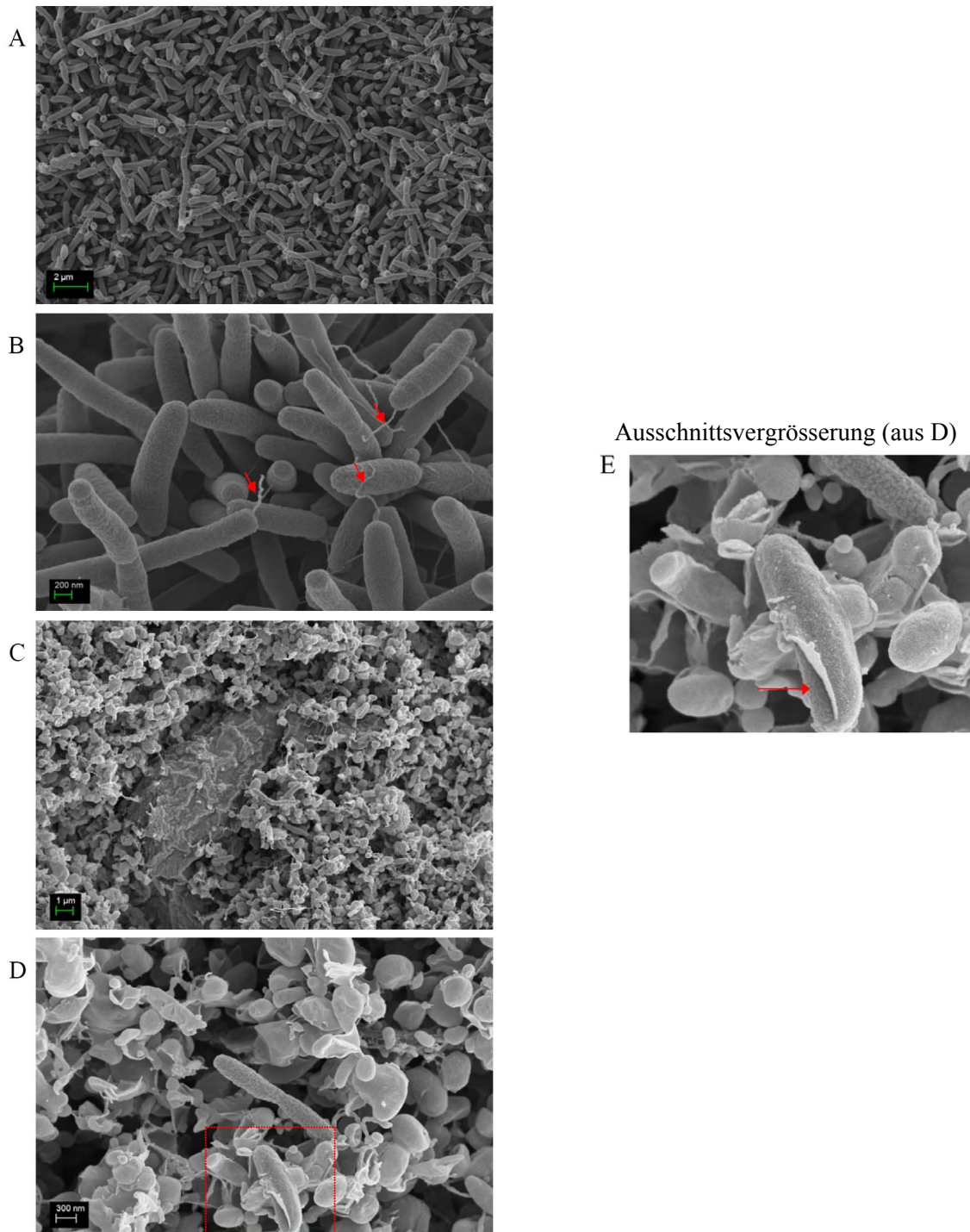


Abb. 4.34 REM Aufnahmen von den Regionen a und b der untersuchten Scatterkolonien. Region a: (A, B) das Zentrum der Scatterkolonien entspricht normalen Kolonien und stellt den Rest der Bakterienkolonie dar, der noch nicht von Amöben durchsetzt ist. Es sind hier *L. pneumophila* Bakterien zu sehen, die grösstenteils flagelliert sind (Pfeile). Region b: (C, D, E) Region a wird von einem Ring umgeben, der mit dem Auge betrachtet wie Bakterienmaterial aussieht. Die Aufnahmen zeigen aber, dass sich in diesem Bereich sowohl Amöben als auch Legionellen befinden. Es sind überraschend wenig Legionellen zu erkennen. Anstelle dessen sind die Amöben von sehr grossen Mengen vesikulärer Strukturen (250 bis 500nm Durchmesser) umgeben, die grösstenteils kugelig und teilweise stäbchenförmig aussehen. Abb. D und E zeigen ein beschädigtes stäbchenförmiges Vesikel, möglicherweise befindet sich ein *Legionella* Bakterium im Inneren dieser Struktur, wie die Oberflächenstruktur der inneren erkennbaren Schicht vermuten lässt (Pfeil).

Ergebnisse

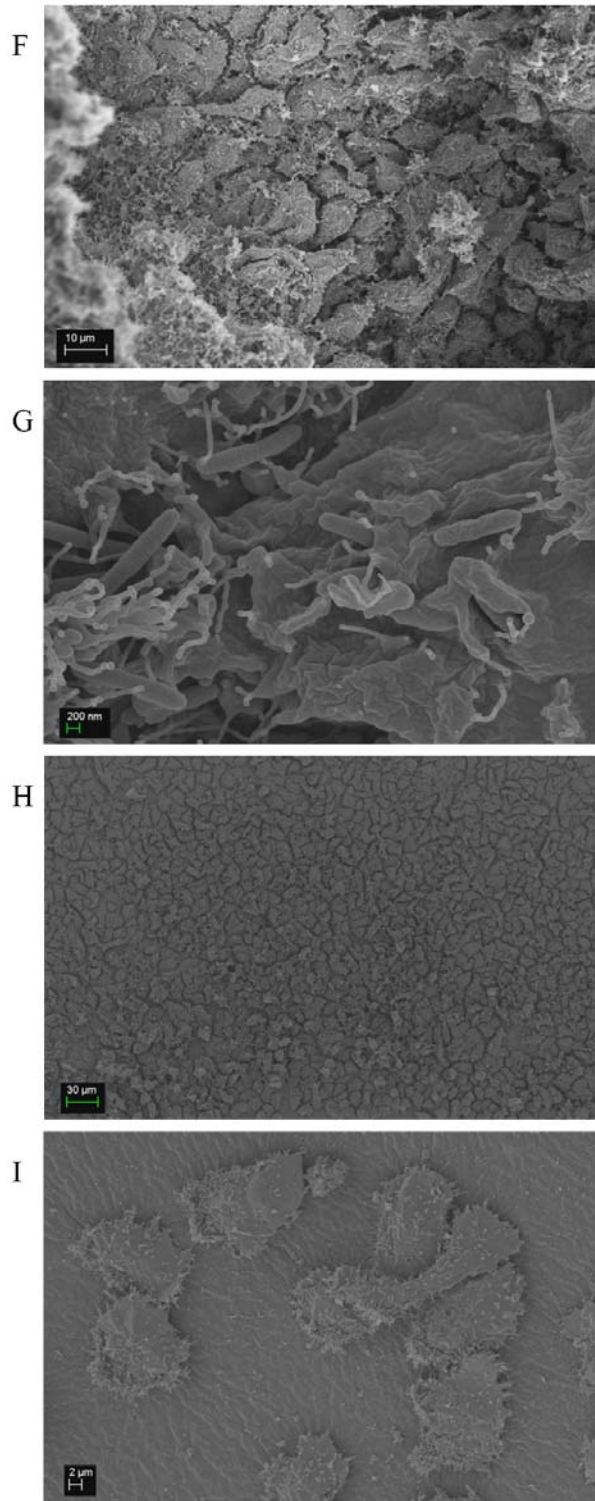


Abb. 4.35 REM Aufnahmen von den Regionen c und d der untersuchten Scatterkolonien. Region c: (F, G) F: Links im Bild ist das Ende von Region b zu erkennen sowie die sehr dicht gedrängten Amöben, welche phagozytotisch aktiv sind und Legionellen einschliessen (Bild G). Region d: Der äusserste Rand der Scatterkolonien ist durch einen Amöbenrasen gekennzeichnet, der sich in der Peripherie langsam ausdünn. Legionellen sind in den äusseren Bereichen dieser Region nicht vorhanden (H, I).

4.2.2 Etablierung des *Scatter*-Phänotyps als Mittel zum Hochdurchsatz-screenen auf Wirtszellkolonisationsdefekte von *L. pneumophila*

Die Ausbildung der Scatterkolonien wurde bei den im Amöbenmodell replikationsdefekten *L. pneumophila patA* Mutanten (siehe 4.1.4.4) entdeckt. Daher war es naheliegend zu untersuchen, ob auch andere replikationsdefekte *Legionella* Mutanten Scatterkolonien ausbilden. Dazu wurden zunächst *L. pneumophila dotA* und *lspD* Mutanten, beides Stämme, die im Amöbeninfektionsmodell replikationsdefekt sind, dem *Scattertest* unterzogen. Diese Mutanten bildeten ebenso wie die *patA* Mutante Scatterkolonien aus. Es konnte somit aufgrund der Vorversuche angenommen werden, dass Mutanten, die unfähig zur Vermehrung in z.B. Amöben sind, Scatterkolonien ausbilden, d.h. von den Amöben eliminiert werden.

Daraus entwickelte sich die Idee, dass die Ausbildung der mit bloßem Auge sichtbaren Scatterkolonien eine einfache Möglichkeit bietet, eine umfangreiche, randomisiert mutagenisierte *L. pneumophila* Klonbank auf Amöbenresistenz zu testen und dabei solche Klone zu selektieren, die durch die Mutation ihre Amöbenresistenz eingebüßt haben. Die anschließende Identifizierung des Transposon-Insertionsortes in den amöbensensitiven Klonen würde es ermöglichen, in einem Schritt *L. pneumophila* Gene zu detektieren, die direkt und in massgeblicher Weise an der Fähigkeit der Bakterien zur Amöbenkolonisierung beteiligt sind. Die Analyse der identifizierten Mutanten kann die betroffenen Gene schliesslich als Virulenzgene identifizieren. Der Test erlaubt daher in einem Hochdurchsatzverfahren neue Virulenzgene von *L. pneumophila* zu identifizieren.

Für die Durchführung des Scattertests wurde eine Transposon Tn5 mutagenisierte *L. pneumophila* Philadelphia-1 Klonbank generiert, welche das *Legionella* Genom statistisch umfassend abdeckte, d.h. mit hoher Wahrscheinlichkeit für jedes *L. pneumophila* Gen mindestens eine Mutante enthielt. Dabei wurde wie in den folgenden Kapiteln beschrieben vorgegangen.

4.2.3 Herstellung einer *L. pneumophila* Tn5 Insertionsmutanten-Klonbank

Die kritische Menge von Insertionsmutanten, die benötigt wird, um mit einer Wahrscheinlichkeit von mindestens 95% jedes der rund 3000 *L. pneumophila* Gene in der Klonbank vom Transposon getroffen zu finden, wurde nach Liberati *et al.* (2006) rechnerisch bestimmt (134).

$$p = 1 - [1 - (l/g)]^n$$

p: Wahrscheinlichkeit, dass jedes Gen mindestens ein Mal getroffen wird

l: durchschnittliche Länge der Gene (1.160bp)

g: Genomgröße (3.397.754bp)

n: Zahl der Mutanten (11.300)

Ergebnisse

Um die erforderliche Transpositionseffizienz zum Erreichen der benötigten Mindest-Klonzahl zu erlangen, wurde zunächst das Transformationsprotokoll erfolgreich optimiert. Dies ermöglichte es schliesslich, in drei Transformationsexperimenten insgesamt 11.300 Transposon Insertionsmutanten zu erzeugen. Unter Anwendung der oben genannten Gleichung ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von rund 98%, dass jedes Gen von *L. pneumophila* Philadelphia-1 mindestens einmal durch das Transposon getroffen wurde, die Klonbank also das gesamte *Legionella* Genom repräsentierte. Um zu prüfen, dass das Transposon tatsächlich nur einmal in das Chromosom integriert und daraufhin an diesem Ort verbleibt, wurden 20 Insertionsmutanten zufällig ausgewählt und im *southern blot* überprüft (nicht gezeigt). Hierbei bestätigte sich, dass bei allen 20 geprüften Klonen das Transposon tatsächlich an nur einer und jeweils anderen Stelle ins Genom integriert war.

4.2.4 Screen der *L. pneumophila* Klonbank auf Kolonisationsdefekte

Die aus 11.300 Insertionsmutanten bestehende Klonbank wurde gemeinsam mit den Amöben auf Agarplatten ausgebracht. Ziel war, die Koloniedichte so einzustellen, dass einerseits ausreichend distinkte Kolonien heranwachsen, um gut zähl- und isolierbar zu sein. Die Agarplatten sollten andererseits auch dicht genug bewachsen sein um den Materialverbrauch niedrig zu halten. Die Ansätze ($\Sigma 26.000$ Mutanten) wurden so aufgebracht, dass 150 bis 200 CFU pro Platte heranwuchsen. Wie im Methodenteil besprochen, wurden diese Platten für drei Tage bei 37°C inkubiert und anschliessend bei Raumtemperatur gelagert. Während der Lagerung wurden die Platten täglich begutachtet und Bakterienmaterial der Kolonien, die die Scattermorphologie ausbildeten, isoliert (Abb. 4.36).

Während sieben-tägiger Lagerung bei Raumtemperatur und täglicher Begutachtung wurden auf diese Weise 119 Scatterkolonien isoliert. Zusätzlich wurden 6 Kontrollkolonien, die wie der Wildtypstamm keine Scattermorphologie ausbildeten, gepickt.

Um zu prüfen, ob die amöbensensitiven Mutanten tatsächlich für ihre intrazelluläre Vermehrung attenuiert waren, wurden die Scattermutanten in Amöbeninfektionsmodellen quantitativ untersucht.

Ergebnisse

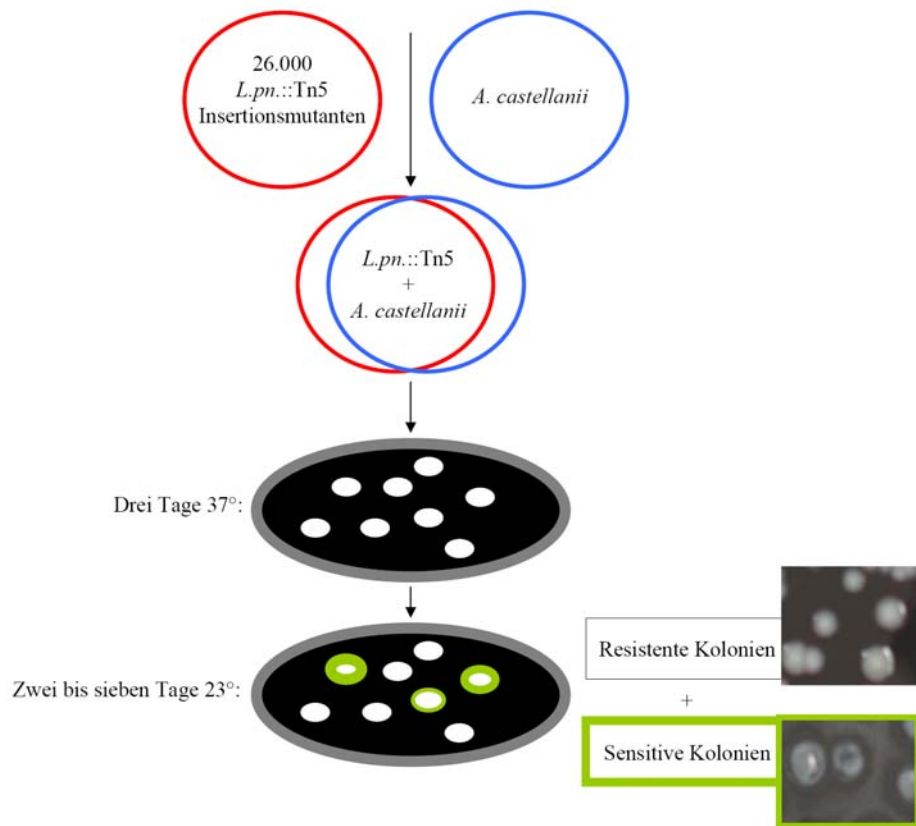


Abb. 4.36 Untersuchung der *L. pneumophila* Tn5 Insertionsklonbank im Scatterscreen. *L. pneumophila* Philadelphia-1 Mutanten und *A. castellanii* wurden auf BCYE Agar kultiviert und für zwei bis sieben Tage bei Raumtemperatur gelagert. Kolonien, die den Scatterphänotyp entwickelten, wurden isoliert.

4.2.5 Evaluierung der Scattermutanten im quantitativen Infektionsmodell

Die Hypothese, dass Insertionsmutanten mit Scattermorphologie Kolonisationsdefekte besitzen, wurde mit quantitativen Analysen der intrazellulären Vermehrung von Scatterklonen evaluiert. Hierzu fanden zwei Infektionsmodelle Anwendung: a) quantitative *A. castellanii* Amöbeninfektionen und b) quantitative U937 Makrophageninfektionen. Beide Zelltypen sind Wirtszellen von *L. pneumophila*, deren Infektion sich mechanistisch zum grossen Teil ähnelt (siehe 2.2.1).

a) Koinfektionen mit *A. castellanii*

Die 119 isolierten *L. pneumophila* Insertionsmutanten mit Scattermorphologie wurden im Amöbeninfektionsmodell auf intrazelluläre Vermehrung untersucht. Als Negativkontrolle wurde die *L. pneumophila patA* Mutante (Klon M1-8) verwendet, die in ihrer intrazellulären Vermehrung attenuiert ist (4.1.4.4). Als Positivkontrolle dienten sechs isolierte Kolonien (K1-K6), die keine Scattermorphologie entwickelten. Letztere sollten sich gemäß der Hypothese auch im quantitativen Infektionsmodell vermehren. Abb. 4.37 zeigt beispielhaft eine *A.*

Ergebnisse

castellanii Infektion mit 4 Scatterklonen, der *patA* Mutante als vermehrungsdefekte Kontrolle (*patA*-), einem nicht-Scatterklon (K5) sowie dem *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtypstamm.

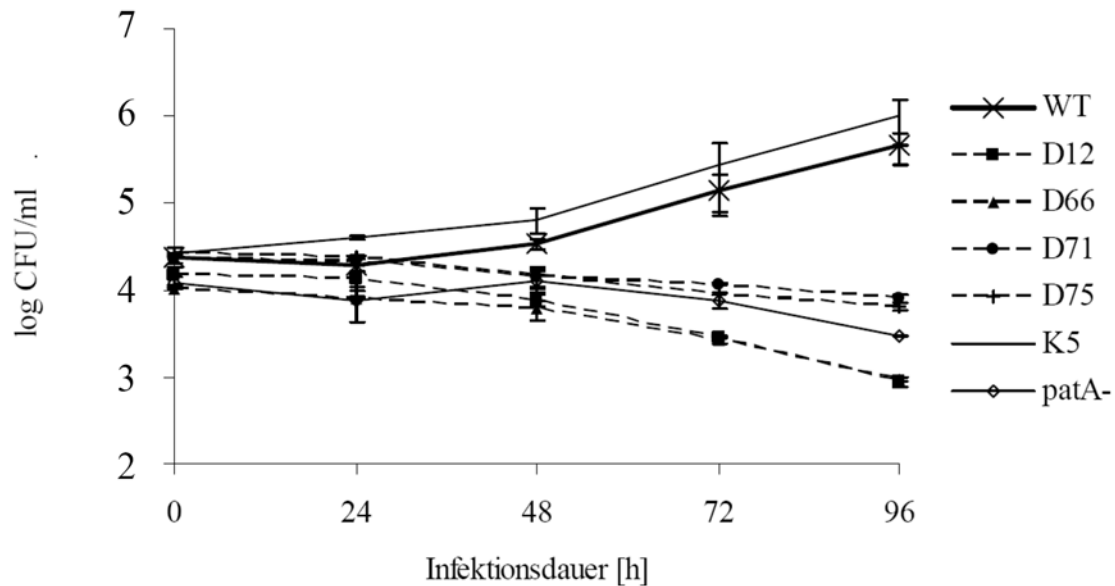


Abb. 4.37 *L. pneumophila* Scattermutanten sind in *A. castellanii* Amöben replikationsdefekt. Dargestellt ist die Vermehrung von vier Scatterklonen (D12, D66, D71, D75), einem nicht-Scatterklon (K5), der vermehrungsdefekten *L. pneumophila patA* Mutante (*patA*-), sowie dem *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtypstamm. Der Wildtypstamm und die nicht-Scattermutante vermehren sich, die *patA* Mutante sowie die 4 Scattermutanten vermehren sich nicht. Die Daten repräsentieren Doppelwerte (zwei Wiederholungen).

In der Beispielinfection, die in Abbildung 4.37 dargestellt ist, vermehrte sich der *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtypstamm um ca. 1,5-2 logarithmische Einheiten. Die *patA*-Mutanten Kontrolle sowie vier der dargestellten Scatterklone vermehren sich nicht (D12, D66, D71, D75). Im Gegenteil, es sinkt die Zahl kultivierbarer Klone im Infektionsmodell. Wie erwartet vermehrte sich der amöbenresistente Kontrollklon (K5) auf Wildtypniveau.

Abb. 4.38 gibt eine Übersicht der intrazellulären Vermehrung aller 119 im Screen isolierten Scattermutanten sowie der sechs Kontrollklone ohne Scattermorphologie (K1 bis K6).

Von den 119 untersuchten Scattermutanten waren 112 für die intrazelluläre Replikation in Amöben vollständig attenuiert. Drei der 112 attenuierten Stämme zeigten eine schwächere Vermehrung im Vergleich zum Wildtypstamm. 7 Stämme wurden im Scatterscreen isoliert, die trotz des Phänotyps auf der Agarplatte in der Lage waren, sich wildtypähnlich im Amöbenmodell zu vermehren. Insgesamt waren also 95% der im Scatterscreen isolierten und deshalb vermutlich attenuierten *Legionella*-Mutanten im Infektionsmodell tatsächlich attenuiert. 5% der 119 getesteten Mutanten waren aufgrund ihrer vermuteten Attenuation isoliert worden, zeigten jedoch keine attenuierte Vermehrung im Amöbenmodell. Bei

Ergebnisse

nochmaliger PCR Analyse der 7 nicht-replikationsdefekten Klone stellte sich heraus, dass vier dieser Klone Mischklone waren (D34, D57, A10, A11). Das ist vermutlich der Grund für ihre Vermehrung, was die Fehlerrate von 5% weiter reduzieren würde.

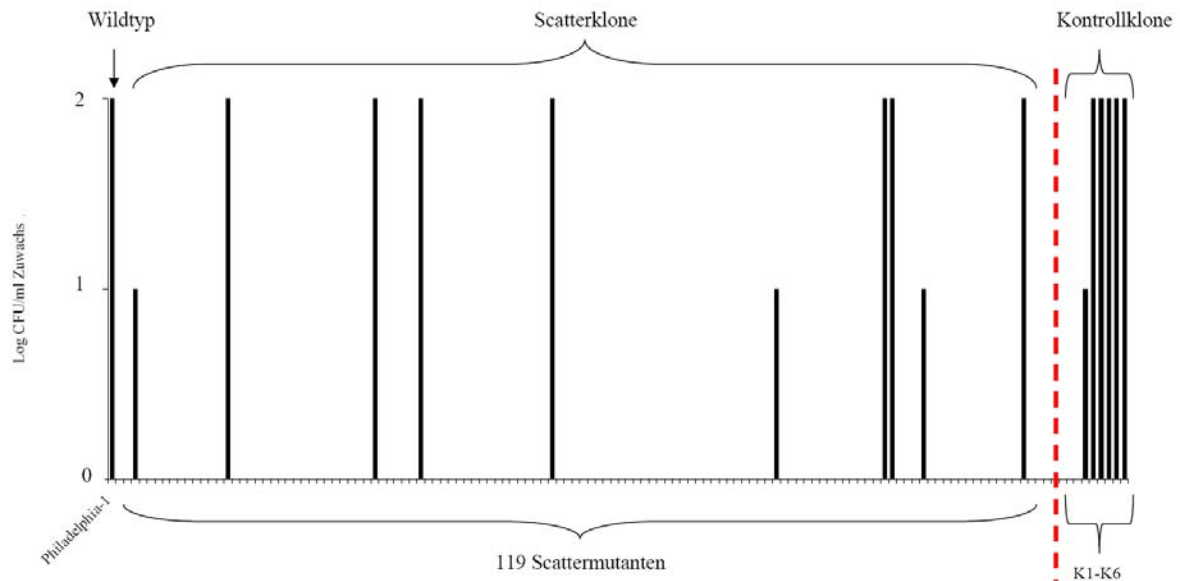


Abb. 4.38 Bakterielle intrazelluläre Replikation im Amöbeninfektionsmodell [(CFU/ml 72h) – (CFU/ml 0h)] von 119 Scattermutanten, *L. pneumophila* Philadelphia-1 und 6 Kontrollmutanten. Die Bakterienzahl des Wildtypstamms erhöhte sich durchschnittlich um zwei logarithmische Einheiten im Vergleich zum Infektionsstart. Sieben der isolierten Scattermutanten, D15, D34, D40, D57, A10, A11 und A28 vermehrten sich auf Wildtypniveau. Drei Scattermutanten (D3, D86, A15) waren nicht vollständig attenuiert, die Bakterienzahl erhöhte sich etwa 10-fach. 5 der insgesamt 6 isolierten Kontrollklone die keinen Scatterphänotyp zeigten verhielten sich äquivalent zum Wildtyp und vermehrten sich ca. 100-fach.

b) Koinfektionen mit U937 Makrophagen

Ausgewählte Scattermutanten wurden zusätzlich im quantitativen U937 Makrophageninfektionsmodell auf ihre intrazelluläre Vermehrung hin untersucht. In Abb. 4.39 sind *A. castellanii*-Infektionen und U937-Infektionen mit einigen ausgewählten Scattermutanten gegenübergestellt.

Die Kontrollklone (Wildtypstamm, *patA* Mutante und Kontrolle K4) zeigten in beiden Infektionsmodellen ein äquivalentes Vermehrungsverhalten. Wildtyp und Kontrolle K4 vermehrten sich um 1,5 bis 2 logarithmische Einheiten (*A. castellanii*) bzw. 2,5 bis 3 logarithmische Einheiten (U937). Die *patA* Mutante war vollständig attenuiert. Der Scatterklon D15 vermehrte sich in beiden Infektionsmodellen wildtypähnlich. Die fünf weiteren dargestellten Scatterklone waren in ihrer intrazellulären Vermehrung in beiden Wirtszellsystemen stark eingeschränkt. Zwei dieser Klone waren sowohl in Amöben als auch in Makrophagen vollständig attenuiert (D19, D25), vermehrten sich also nicht. Drei der

Ergebnisse

Scatterklone (D8, D1, D17) waren in Amöben vollständig attenuiert, vermehrten sich jedoch in Makrophagen leicht um das etwa fünffache im Vergleich zur Anfangszellzahl.

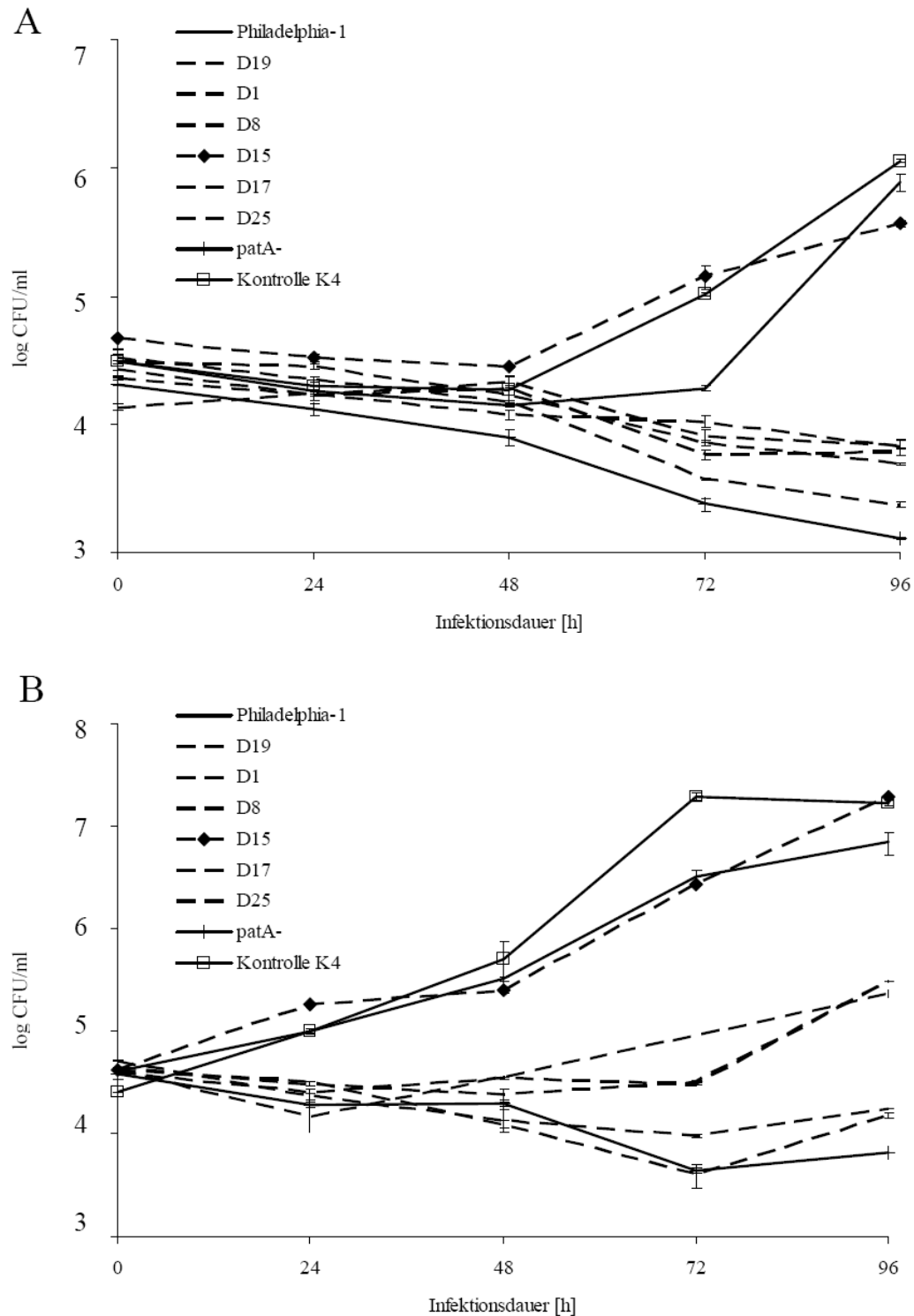


Abb. 4.39 *L. pneumophila* Scattermutanten sind in *A. castellanii* (A) und U937 Makrophagen (B) replikationsdefekt. Dargestellt ist die Vermehrung von sechs Scatterklonen, einem nicht-Scatterklon (Kontrolle K4), der vermehrungsdefekten *L. pneumophila patA* Mutante (*patA*-), sowie *L. pneumophila* Philadelphia-1. In beiden Infektionsmodellen vermehrten sich der Wildtypstamm, die nicht-Scattermutante sowie ein Scatterklon (D15). Die *patA*- Mutante sowie 5 Scattermutanten vermehrten sich nicht oder stark eingeschränkt. Die Daten repräsentieren Doppelwerte (zwei Wiederholungen).

Ergebnisse

Es kann also zusammenfassend gesagt werden: Die im Scattertest selektierten amöbensensitiven Klone replizierten in der Regel in quantitativen Amöben- und Makrophageninfektionen nicht oder mit starken Einschränkungen. Die amöbenresistenten Klone, welche als Kontrollen isoliert worden waren, replizierten erwartungsgemäß in beiden Infektionsmodellen uneingeschränkt. Daher bestätigen die quantitativen Infektionsexperimente die Hypothese, dass Klone, die Scatterkolonien ausbilden, schlechter Amöben (und eventuell auch andere Wirtszellen) kolonisieren und sich intrazellulär nicht oder weniger replizieren können. Die Überprüfung der Scattermutanten in Amöben- und Makrophageninfektionsmodellen evaluieren den Scattertest deshalb als grundsätzlich funktionell. Sie bestätigen sein grosses Potenzial, neue Wirtszellkolonisationsgene von *L. pneumophila* zu identifizieren.

4.2.6 Identifizierung der Tn5 Insertionsorte im Chromosom von Scattermutanten

Bei den Mutanten, deren attenuierte intrazelluläre Replikation sich in den Infektionsmodellen bestätigte, wurde der Ort der Transposoninsertion im *L. pneumophila* Chromosom mit Hilfe von inverser PCR (164) und anschliessender Sequenzierung bestimmt. Zusätzlich wurden die Orte der Transposoninsertion in 2 der Kontrollen bestimmt. Mit dieser Vorgehensweise konnten die Orte der Transposoninsertion in den 112 isolierten, attenuierten Scattermutanten erfolgreich ermittelt werden. Abb. 4.40 zeigt die Verteilung der Tn5 Insertionen innerhalb der 3005 annotierten *L. pneumophila* Philadelphia-1 Gene in einer Übersicht.

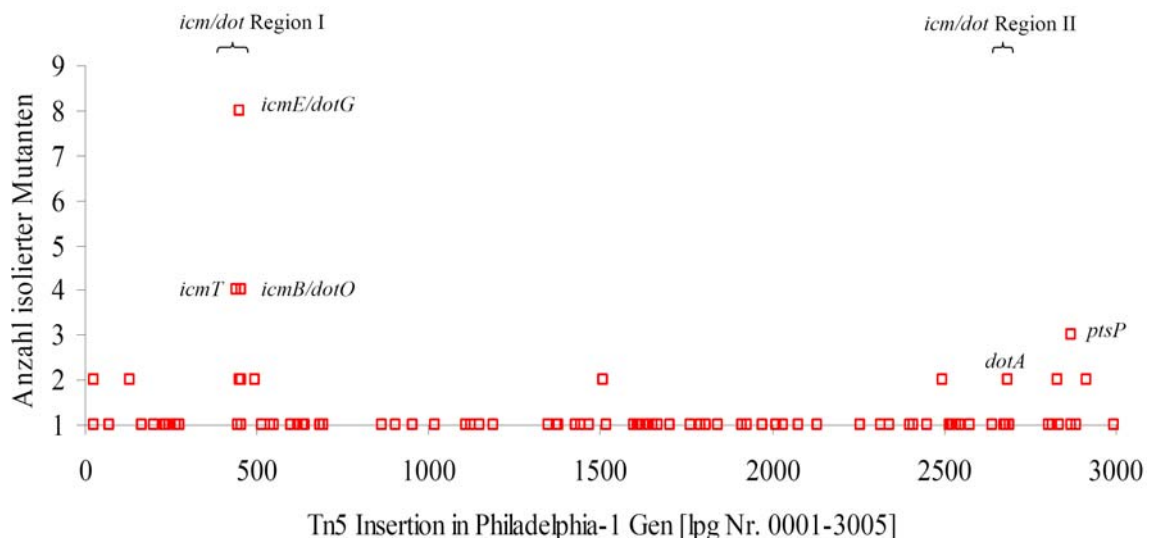


Abb. 4.40 Die 112 isolierten amöbensensitiven Transposoninsertionsmutanten tragen Tn5 Insertionen, die über das gesamte Genom verteilt sind. Eine Häufung von Insertionsmutanten fand sich in den beiden *icm/dot* Virulenzregionen, die ein TypIVB Sekretionssystem kodieren (204,231). Neben den vielfach gefundenen Insertionen in *icm/dot* Genen wurden u.a. drei *L. pneumophila* *ptsP* (Phosphoenolpyruvat Phosphotransferase) Mutanten (D22, D69, A20) (103) identifiziert.

Ergebnisse

Im Scatterscreen wurden Mutanten identifiziert, die einen weiten Bereich des Genoms von *L. pneumophila* Philadelphia-1 abdecken. Da unsere Experimente dem Nachweis neuer *L. pneumophila* Wirtszellkolonisationsgene dienen sollten, wurden die von der Tn5-Insertion betroffenen Gene in zwei Gruppen unterteilt. Der ersten Gruppe wurden Gene zugeordnet, die bereits im Zusammenhang mit der Wirtszellkolonisation oder Virulenz von *L. pneumophila* charakterisiert wurden (Tab. 4.1). Die zweite Gruppe beinhaltet Gene, die mit der Wirtszellkolonisierung und Virulenz noch nicht korreliert wurden oder von denen Orthologe in anderen Bakterien existieren, die im Zusammenhang charakterisiert wurden (Tab. 4.2, Tab. S1 im Anhang).

4.2.6.1 Übersicht der identifizierten Gene

Tabelle 4.1 zeigt alle im Scattertest identifizierten Gene, die bereits vorher im Zusammenhang mit der Wirtszellkolonisierung und Virulenz von *L. pneumophila* charakterisiert wurden. Unter den 112 isolierten amöbensensitiven Mutanten befanden sich 36, die die Tn5 Insertion in einem bekannten Kolonisations- oder Virulenzgen trugen. Da einige Mutanten mehrfach auftraten, ergaben sich letztlich 19 verschiedene Gene, die bereits charakterisierte Kolonisations- oder Virulenzfaktoren von *L. pneumophila* darstellen. Unter ihnen befanden sich 11 Gene aus den zwei *dot/icm* Regionen, die ein TypIVB Proteinsekretionssystem kodieren: *icmT*, *P*, *O*, *M*, *E*, *C*, *J*, *B*, *X* sowie *dotA* und *dotC*. Viele der *dot/icm* Gene wurde mehrfach identifiziert, allen voran *icmE/dotG*, was in 8 Scatterklonen mutiert war. Neben diesen Genen wurden 8 weitere Virulenzgene identifiziert, die von anderen Forschergruppen als für die Wirtszellkolonisation/Virulenz kritisch beschrieben wurden (Tab. 4.1). Dazu gehören z.B. die Gene *ptsP* und *rtxA*. *L. pneumophila ptsP* (Phosphoenolpyruvat Phosphotransferase)-Mutanten replizieren stark eingeschränkt in Makrophagen und zeigen eine reduzierte Virulenz im Meerschweinchenmodell (103). Das *L. pneumophila* „repeats in structural toxin“ und Hämolysin RtxA spielt eine Rolle in der Wirtszellinvasion und intrazellulärer Replikation des Bakteriums. *rtxA knock out*-Mutanten zeigen reduzierte Virulenz im Mausmodell (45).

Ergebnisse

Tab. 4.1 Bekannte *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wirtszellkolonisations/Virulenzgene, die im Scatterscreen identifiziert wurden.

<i>lpg</i> Nr:	gi	Genname	Funktion	Mutante:	Referenzen
0025	52840281	<i>rcp</i>	Verleiht Resistenz gegen kationische antimikrobielle Reagentien	D74	(178)
0441	52840686	<i>icmT</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D45, D46, D49	(204,231)
0445	52840690	<i>icmP/dotM</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D73	(204,231)
0446	52840691	<i>icmO/dotL</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D53	(204,231)
0448	52840693	<i>icmM/dotJ</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D39, D48	(204,231)
0451	52840696	<i>icmE/dotG</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D5, D10, D20, D26, D43, D55, D68, D72	(204,231)
0454	52840698	<i>icmC/dotE</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D47	(204,231)
0455	52840700	<i>icmJ/dotN</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D2, D14	(204,231)
0456	52840701	<i>icmB/dotO</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion I	D1, A9, A24, A25	(204,231)
0693	52840930	<i>ligA</i>	<i>L. pneumophila</i> "infectivity gene A"	D89	(66)
0864	52841100	<i>ccmH</i>	Zytochrom C Biogenese	D11	(160,171,230)
1791	52842018	<i>fliN</i>	Flagellen Motorprotein	D21	(56,59,101)
2341	52842551	<i>dnaJ</i>	Hitzeschockprotein, Hsp40 Familie	D25	(165)
2515	52842723	<i>rtxA</i>	Toxin, Beteiligt an Eintritt und Replikation der Bakterien in Wirtszellen	A17	(45,47)
2639	52842845	<i>enhC</i>	Erhöht die Invasivität in Wirtszellen	A13	(46,136)
2675	52842881	<i>dotC</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion II	D16	(185,211)
2686	52842892	<i>dotA</i>	Teil und Effektor der <i>dot/icm</i> Genregion II	D33, D35	(204,231) (157)
2689	52842895	<i>icmX</i>	Teil der <i>dot/icm</i> Genregion II	D23	(185,211)
2871	52843066	<i>ptsP</i>	Unmittelbar an <i>in vivo</i> Virulenz beteiligt	D22, D69, A20	(103)

Der grösste Teil der isolierten Scattermutanten (76 Mutanten) trug die Tn5 Insertion in Genen, die vorher noch nicht direkt auf die Wirtszellkolonisierung/Virulenz von *L.*

Ergebnisse

pneumophila bezogen wurden. Eine Auswahl von 10 solchen Genen ist in Tabelle 4.2 zusammengestellt, die vollständige Liste findet sich im Anhang (Tab.S1).

Tab. 4.2 Neue putative *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wirtszellkolonisierungs/Virulenzgene, die im Scatterscreen identifiziert wurden. Zum besseren Bezug auf die vier sequenzierten *L. pneumophila* Genome sind die *Locus-tags* für *L. pneumophila* Philadelphia-1 (Lpg), Corby (Lpc), Paris (Lpp), Lens Lpl) angegeben. Die *e-values* homologer Gene wurden mittels BLAST Algorithmus ermittelt. (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). *Konservierte Domänen

Gen	ID	gi	Name	putative KD*	Nächstes Homolog	e-value	Ref.
<i>lpg0072</i> <i>lpc0094</i> <i>lpp0086</i> <i>lpl0084</i>	A4	52840327	excinuclease ABC subunit B	ABC_ATPase, HELICe, UVR	Excinuclease ABC subunit B [<i>Pseudomonas mendocina ymp</i>]	0.0	(97) (89)
<i>lpg0129</i> <i>lpc0149</i> <i>lpp0143</i> <i>lpl0128</i>	D18	52840384	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	LuxC	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Aeromonas salmonicida</i>]	1E-164	(131)
<i>lpg0230</i> <i>lpc0305</i> <i>lpp0299</i> <i>lpl0283</i>	D71	52840485	PleD, sensor histidine kinase	GGDEF, Chase3	PleD-like protein [<i>Synechocystis sp.</i>]	8E-79	(117,167) (80)
<i>lpg0265</i> <i>lpc0341</i> <i>lpp0339</i> <i>lpl0317</i>	D62	52840520	multicopper oxidase	Cu-Oxidase	putative multicopper oxidase [<i>Methylobacterium nodulans</i>]	4E-90	(132,148)
<i>lpg0635</i> <i>lpc2659</i> <i>lpp0689</i> <i>lpl0672</i>	D37	52840872	melittin resistance protein	PMT	probable melittin resistance protein [<i>Chromobacterium violaceum</i>]	0.0	(62,83)
<i>lpg1426</i> <i>lpc0842</i> <i>lpp1381</i> <i>lpl1377</i>	D81	52841656	hypothetical protein	Patatin (PatF)	hypothetical protein RT0522 [<i>Rickettsia typhi</i> str. Wilmington]	2,00E-17	(18,197) (169)
<i>lpg1665</i> <i>lpc1095</i> <i>lpp1636</i> <i>lpl1630</i>	D66	52841893	hypothetical protein	A2M_N_2, Isopren_C2_like	alpha-2-macroglobulin domain protein [<i>Burkholderia cenocepacia</i>]	0.0	(12,31)
<i>lpg2316</i> <i>lpc1783</i> <i>lpp2264</i> <i>lpl2236</i>	D12	52842526	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	AdoHcyase	3-hydroxybutyrate dehydrogenase [<i>Deftia acidovorans</i>]	1,00E-112	(7,116)
<i>lpg2494</i> <i>lpc1980</i> <i>lpp2561</i> <i>lpl2415</i>	D75	52842702	hypothetical protein	Cyclase	Kynurenine formamidase [<i>Methylokoris infernorum</i>]	1,00E-25	(126)
<i>lpg2835</i> <i>lpc3119</i> <i>lpp2892</i> <i>lpl2747</i>	D92	52843031	thiopurine S-methyltransferase	Methyltransf_11	thiopurine S-methyltransferase [<i>Shewanella baltica</i>]	3,00E-37	(102)

Ergebnisse

Unter den 70 verschiedenen Genen, die in den 76 Mutanten unterbrochen waren, befanden sich zahlreiche unklassifizierte und hypothetische Gene (30 Gene). Viele der Gene besitzen konservierte Domänen, die Rückschlüsse auf ihre putative Funktion zulassen (52 Gene, darunter viele als hypothetisch annotiert). Von besonderem Interesse sind dabei Proteine, die konservierte Proteindomänen tragen die vor allem aus höheren Lebewesen bekannt sind. Dies sind z.B. Lpg1426 (PatF), welches eine Patatindomäne trägt, oder Lpg1665, welches eine A2M_N_2 α -2-Makroglobulindomäne trägt, die experimentell bisher nur in Eukaryonten untersucht ist. Weiter fanden sich viele Gene, von denen Orthologe in anderen Organismen existieren, die zum Teil bereits umfassend charakterisiert wurden, z.B. *E. coli* UvrB (in Mutante A4 [lpg0072]), *Streptococcus pneumoniae* MmsA (in Mutante D18 [lpg0129], *Pseudomonas putida* CopA (in Mutante D62 [lpg0265]). Es wurden 9 Gene identifiziert, bei denen mittels BLAST-Suche keinerlei Protein-Homologe ausserhalb *L. pneumophila* gefunden werden konnten, die also *L. pneumophila* spezifisch vorkommen (natürlich nur unter Berücksichtigung der sequenzierten Organismen).

Bei der Annotation von uncharakterisierten Genen werden putative funktionelle Voraussagen gemacht, die aufgrund charakterisierter Homologe, konservierter Proteindomänen oder bekannten Proteinmotiven angegeben werden. Die Datenbank „TIGR-CMR“ fasst diese funktionellen Zuordnungen in Farbcodes zusammen, die Kategorien wie z.B. „Proteinsynthese“ oder „Adaptation an atypische Bedingungen“ kennzeichnen. Für die Tabelle S1, die bisher unbekannte putative *L. pneumophila* Kolonisations oder Virulenzgene abbildet, wurden die Farbcodes von „TIGR-CMR“ übernommen und den identifizierten Genen zugeordnet, um einen Überblick zu erhalten, in welche funktionellen Kategorien Tn5 Insertionen identifiziert wurden. Abb. 4.41 fasst die relative Verteilung der funktionellen Kategorien aus Tabelle S1 zusammen. Die in amöbensensitiven Mutanten durch Tn5 Insertion am häufigsten unterbrochenen Gene waren demnach den Kategorien „Zellhülle Biosynthese & Degradation, Struktur“ (17%), „Proteinschicksal, Modifizierung, Sekretion und Degradation“ (15%) und "Energiestoffwechsel" (13%) zuzuordnen. 10% der Gene betrafen die Rubrik „DNA Metabolismus“ und jeweils 8% sind den Kategorien „Regulation“, „Proteinsynthese“, „Transport und Bindung von Proteinen“ zuzuordnen. 21% der Gene entstammen anderen Kategorien (Abb 4.41).

Ergebnisse

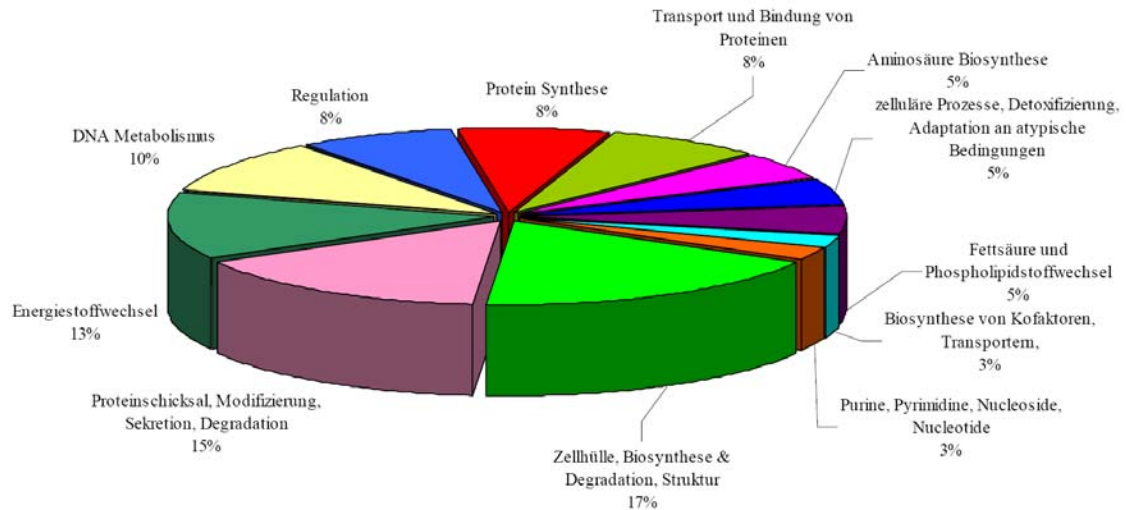


Abb. 4.41 Verteilung der funktionell zugeordneten Kategorien von 70 identifizierten neuen Virulenzgenen. Nicht dargestellt sind hypothetische Proteine oder Proteine mit unbekannter Funktion (31 Gene). Der grösste Anteil der funktionell einordenbaren Gene (17%) betreffen Biosynthese und Struktur der Zellhülle. 15% der identifizierten Gene sind der Kategorie Proteinschicksal („*Protein Fate*“) zuzuordnen. 13% sind Energiestoffwechselgene und 10% spielen eine Rolle im DNA Metabolismus.

In der Scattermutante D12, die im Amöbenmodell eine attenuierte intrazelluläre Replikation zeigte (Abb. 4.37, Tab. 4.2, Tab. S1), war ein Gen der Kategorie „Energiestoffwechsel“ von der Transposoninsertion betroffen. Dieses Gen, *lpg2316*, kodiert eine putative 3-Hydroxybutyrat-Dehydrogenase, ein Protein des PHB Abbaus, und trägt eine konservierte „*short chain dehydrogenase*“ Domäne (Pfam PF00106). Das nächste charakterisierte Homolog ist das *bdhA* Gen (Blast *e-value* 1e-44) des Knöllchenbakteriums *Sinorhizobium* sp.. BdhA ist für die Fähigkeit des Bakteriums zur Verwertung von PHB essentiell. Der Verlust von *bdhA* in *Sinorhizobium* sp. kann zu Störungen in der Ausbildung der Symbiosebeziehung führen. (Abb. 4.42, Abschnitt 4.2.7.1) (6).

Interessanterweise befindet sich in direkter Nachbarschaft strangabwärts zu *lpg2316* ein *Legionella* PLP Gen, *patD* (*lpg2316*). Im Unterschied zu dem zweiten im Scattertest identifizierten PLP *patF* (*lpg1426*) gehört das *patD* Gen zu den am Ende eines intrazellulären Infektionszyklus stark hochregulierten PLP (29). Das kann als Hinweis auf dessen Rolle für die Virulenz des Bakteriums interpretiert werden (siehe 4.1.2). Aus diesem Grund, und wegen dem interessanten Link zum symbiontischen Bakterium *Sinorhizobium* sp. sowie zum PHB Stoffwechsel über *lpg2316*(*bdhA*) wurde der Locus *lpg2316/lpg2317* für eine weiterführende Untersuchung ausgewählt.

Ergebnisse



Abb. 4.42 *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316* und *Sinorhizobium* sp. NGR234 besitzt Homologie (*e-value* 1e-44) über die gesamte Proteinsequenz. Die putativen katalytisch essentiellen Aminosäuren für *Lpg2316* S142, Y155 und K159 (rote Pfeile) (168), sind in beiden Proteinen vorhanden.

4.2.7 Charakterisierung des Lokus *lpg2316* (*bdhA*)/*lpg2317* (*patD*)

Im ersten Abschnitt der Arbeit war das Hauptinteresse auf Patatin-ähnliche Proteine von *L. pneumophila* und deren putative Rolle als Virulenzfaktoren gerichtet. Im Scatterscreen wurde das *Legionella* PLP Gen *patF* (*lpg1426*) als von der Tn5 Insertion direkt betroffen identifiziert. Zusätzlich schien ein weiteres PLP Gen durch die Transposonmutagenese indirekt betroffen. In Mutante D12 wurde das strangaufwärts zum PLP Gen *patD* (*lpg2317*) gelegene Nachbarn *lpg2316* von einer Tn5 Insertion betroffen. Das Computerprogramm „OPERON“ (http://www.cbcb.umd.edu/cgi-bin/operons/pairs.cgi?taxon_id=272624), welches auf der Basis statistischer Wahrscheinlichkeiten die Vorhersage von Operonstrukturen in mikrobiellen Genomen ermöglicht, weist aus, dass *lpg2316* und *lpg2317* (*patD*) ein Operon bilden. Die das putative Operon *lpg2316/2317* flankierenden Gene, *lpg2315* und *lpg2318* (*motA*) sind nach dieser Voraussage nicht Teil des Operons (Abb.4.43).

Bevor also phänotypische Untersuchungen zur Rolle von *lpg2316* in Mutante D12 angestellt werden konnten, war es von Interesse, die Richtigkeit der „OPERON“ Voraussage zu überprüfen. Da die experimentelle Expressionsanalyse des putativen Operons *lpg2316/lpg2317* die Computervoraussage als richtig bestätigte (siehe unten und Abb. 4.44), muss für die Analyse der Mutante D12 berücksichtigt werden, dass die Tn5 Insertion die Expression des *bdhA* Homologs *lpg2316* als auch die des PLP Gens *patD* verhindert.

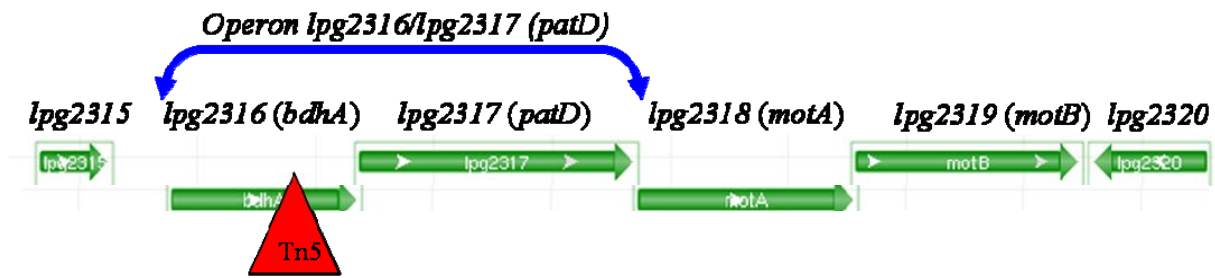


Abb. 4.43 Genomischer Kontext von *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316*. Das Transposon Tn5 war in der Scattermutante D12 in *lpg2316* inseriert. *lpg2316/lpg2317* bilden ein Operon, die flankierenden Gene *lpg2315* und *lpg2318 (motA)* sind nicht Teil dieses Operons (Abbildung adaptiert nach „NCBI sequence viewer 2.0.β“)

Die Transkription des Lokus *lpg2316/lpg2317* wurde mittels RT-PCR analysiert. Sollte tatsächlich eine transkriptionelle Einheit vorliegen, muss ein gemeinsames Transkript in den Bakterien vorliegen (Abb. 4.44, 4.45). Dazu wurden Gen-überlappende Primer generiert, mit denen in der RT-PCR nur dann cDNA generiert wird, wenn ein gemeinsames Transkript der jeweiligen Gene vorliegt, wenn diese also kotranskribiert werden. Dieses Experiment ist in Abb. 4.44 dargestellt. Es wurden dabei drei überlappende Primerpaare eingesetzt: 1. für die Gene *lpg2316 (bdhA)/lpg2317 (patD)*, 2. für *lpg2317 (patD)/lpg2318 (motA)* und 3. für *lpg2318 (motA)/lpg2319 (motB)*.

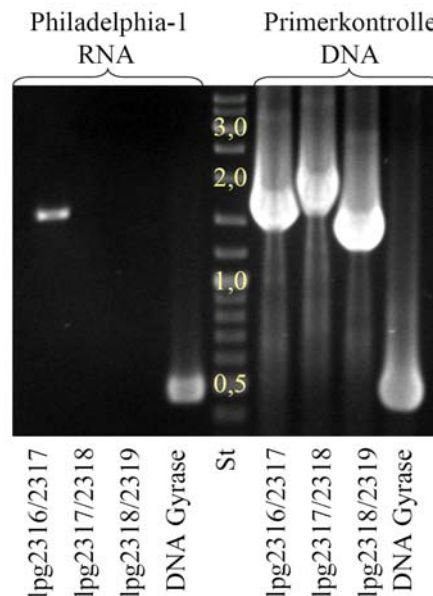


Abb. 4.44 *lpg2316* und *lpg2317* bilden ein Operon. Mit Primern, die jeweils in benachbarten Genen binden, wurden RT-PCRs durchgeführt. Mit dem überlappenden Primerpaar *lpg2316/lpg2317* wurde ein Amplifikat erzeugt, *lpg2316* und *lpg2317* werden daher kotranskribiert. Als Expressionskontrolle wurde bei den RT-PCR Reaktionen DNA-Gyrase Primer (ein konstitutiv exprimiertes „housekeeping“ Gen) verwendet. Als Kontrolle für die gegenüberliegenden Primerpaare wurde chromosomale *L. pneumophila* Philadelphia-1 DNA eingesetzt (rechts).

Ergebnisse

Da *lpg2316/lpg2317* ein Operon bilden (Abb. 4.44), müsste in der Mutante D12 durch die Tn5 Insertion auch die Transkription von *lpg2317* (*patD*) gestört sein. Um dies zu prüfen, wurde die Expression der Einzelgene *lpg2315* bis *lpg2319* in Mutante D12 mittels RT-PCRs überprüft und mit der Expression im Wildtypstamm *L. pneumophila* Philadelphia-1 verglichen (Abb. 4.45).

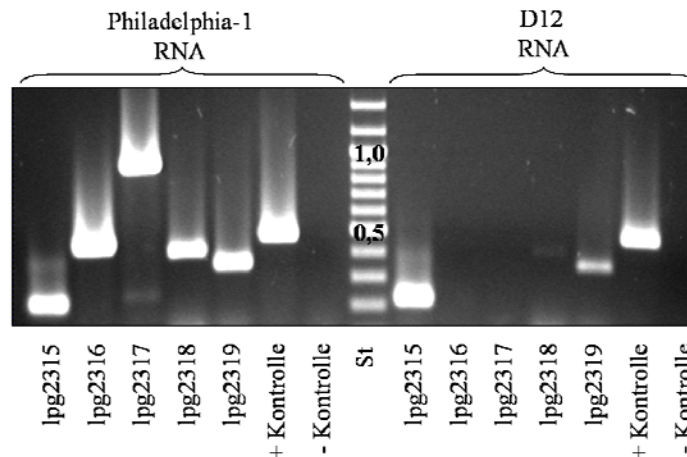


Abb. 4.45 Die Gene *lpg2315* bis *lpg2319* wurden im Wildtypstamm *L. pneumophila* Philadelphia-1 exprimiert, in Mutante D12 fehlten die Transkripte sowohl von *lpg2316* als auch *lpg2317* vollständig. Transkripte von *lpg2315*, *lpg2318* (sehr dünn) und *lpg2319* waren auch in der Mutante vorhanden. Als Positivkontrolle wurde genomische DNA eingesetzt. Als Negativkontrolle wurde RNA eingesetzt und ohne reverse Transkription amplifiziert. Für die geschilderten Kontrollreaktionen wurden Primer für die DNA Gyrase eingesetzt, die konstitutiv exprimiert wird.

Das in Abb. 4.45 dargestellte Experiment bestätigte die Hypothese, dass *lpg2316* und *lpg2317* (*patD*) aufgrund der Transposoninsertion in *lpg2316* in Mutante D12 nicht exprimiert werden, da die Gene ein Operon bilden.

Aus diesem Grund musste bei der Analyse von Mutante D12 der Verlust des funktionellen PLP *patD* Berücksichtigung finden. Da die Tn5 Insertion in Mutante D12 die Expression beider Gene unterbricht, wird im folgenden von der *lpg2316/17* Mutante gesprochen.

4.2.7.1 Untersuchung der PHB Speicher in *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtyp und der *lpg2316/17* Mutante.

Poly-3-Hydroxybutyrat (PHB) kann von Bakterien als intrazellulärer Kohlenstoffspeicher akkumuliert werden, wenn wachstumslimitierende Bedingungen vorliegen, aber ein Überschuss an Kohlenstoff vorliegt. Die intrazelluläre Reserve erlaubt Bakterien, nährstofflimitierte Bedingungen zu überdauern und steigert deren Fitness gegenüber Stressoren (4,118).

Abb. 4.46 gibt einen Überblick über den Aufbau und den Abbauweg von PHB Speichern in Bakterien (37). Um polymerisiertes 3-Hydroxybutyrat zu Azetoazetat und schliesslich Azetyl-

Ergebnisse

CoA zu metabolisieren, bedarf es zunächst PHB Depolymerasen, die das Homopolymer monomerisieren und 3-Hydroxybutyratdehydrogenasen zugänglich machen, die dann 3-Hydroxybutyrat zu Azetoazetat oxidieren. Azetoazetat wird anschliessend in zwei Schritten zu Azetyl-CoA umgebaut und schliesslich über den TCA (Tricarbonsäurezyklus) und Glyoxylat Zyklus metabolisiert (Abb. 4.46) (51,208).

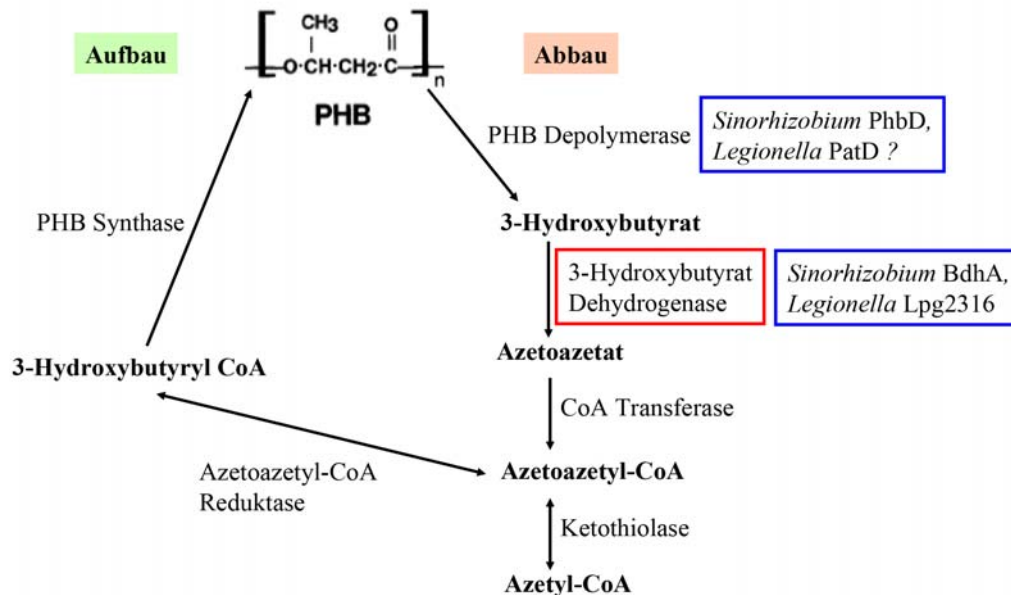


Abb. 4.46 PHB Stoffwechsel in Bakterien. *Legionella* Lpg2316, das *Sinorhizobium* sp. BdhA Homolog, könnte 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase Aktivität besitzen. *Legionella* besitzt kein *Sinorhizobium* sp. PhbD Homolog (PHB Depolymerase). Könnte deswegen Lpg2316 (PatD) in der Lage sein PHB zu depolymerisieren? (Abbildung adaptiert nach (37)).

Sinorhizobium sp. NGR234 (*New Guinea Rhizobium* 234) *bdhA* Mutanten besitzen keine 3-Hydroxybutyrat Dehydrogenase Aktivität mehr und sind im Gegensatz zum Wildtypstamm unfähig, sich mit PHB als einziger Kohlenstoffquelle zu vermehren. Ferner zeigen NGR234 *bdhA* Mutanten Symbiosedefekte, die wirtszellabhängig auftreten (6). PHB Depolymerasen (Abb. 4.46, PhbD) gehören zur Familie der Serin-Histidin-Aspartat (oder Glutamat) Hydrolasen (katalytische Triade) und tragen das Lipase Konsensusmotiv G-X-S-X-G. Daher sind sie den Patatin-ähnlichen Phospholipasen verwandt. Da *Legionella* kein PhbD Homolog besitzt, aber PHB als Nährstoffreserve nutzen kann, stellt sich die Frage, ob das *lpg2317* Genprodukt (PLP PatD) über PHB Depolymeraseaktivität verfügt und ob es gemeinsam mit Lpg2316, dem BdhA Homolog, an der PHB Mobilisierung beteiligt ist. Die folgenden beschriebenen Experimente sollen daher klären, ob das in Mutante D12 durch Tn5 Insertion gestörte Operon *lpg2316/17* eine Rolle im PHB-Stoffwechsel von *L. pneumophila* spielen kann.

Ergebnisse

Um zu überprüfen, ob der PHB Stoffwechsel in Mutante D12 durch den Verlust des funktionellen Operons *lpg2316/17* tatsächlich beeinflusst ist, wurden der Wildtypstamm *L. pneumophila* Philadelphia-1 und die Mutante D12 in Flüssigmedium kultiviert und zu mehreren Zeitpunkten die Zahl von PHB Granula je Bakterium verglichen. 4 Tage lang wurde in 24-stündigen Zeitabständen Bakterienmaterial aus den Kulturansätzen entnommen und fixiert. Anschliessend wurden die Proben mit dem Farbstoff Nile Red behandelt, der die selektive Anfärbung von PHB Einschlüssen in Bakterien erlaubt (90). Die gefärbten Bakterien wurden mikroskopisch begutachtet (Abb. 4.47) und die Lipideinschlüsse je *Legionella* Bakterium ausgezählt (Abb. 4.48).

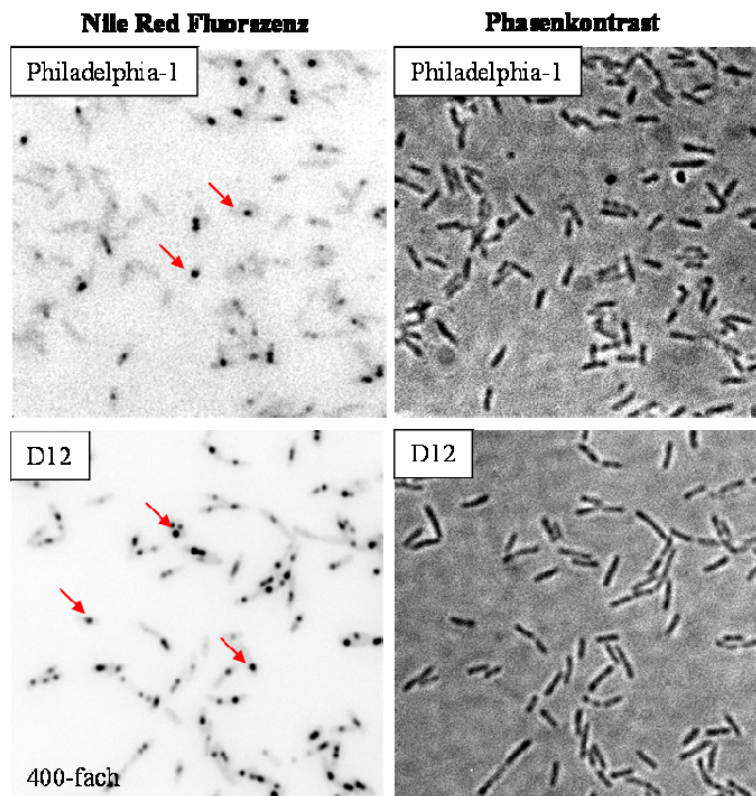


Abb. 4.47 Die *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316/17* Mutante (D12) enthält mehr PHB Granula (Pfeile) je Bakterium als der Wildtypstamm. Fluoreszenzaufnahmen und Phasenkontrastabbildung der Bakterien und der PHB Granula angefärbt mit Nile Red. *Legionella* Wildtyp Bakterien enthalten 0-1 PHB Granulum je Bakterienzelle. *Legionella* D12 Mutanten enthalten ca. 1-3 PHB Granula je Bakterium. Bakterienkulturen wurden 4 Tage in Flüssigmedium kultiviert.

Ergebnisse

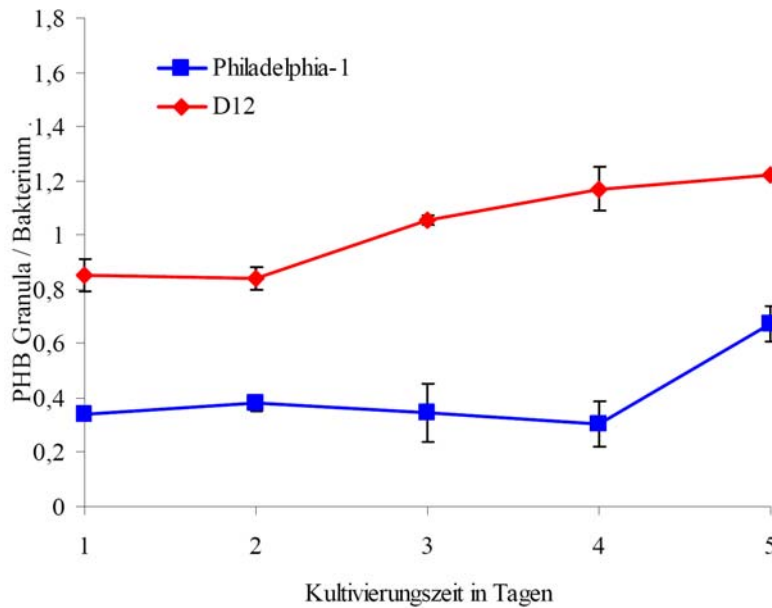


Abb. 4.48 Die *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316/17* Mutante (D12) enthält die zwei- bis dreifache Anzahl PHB Granula je Bakterium wie der Wildtypstamm. Die Anzucht wurde aus einer 24h-Vorkultur gestartet. Die Daten errechnen sich aus 2 mal mindestens 100 ausgezählten Bakterien pro Stamm und Zeitpunkt.

Die Zählung der PHB Granula je Bakterienzelle mittels NileRed Färbung belegte, dass *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316/17* Mutanten (=D12) mehr PHB Granula als der Wildtypstamm enthielten. Dies war bereits unter dem Mikroskop augenscheinlich und wurde durch die Auszählung zu allen fünf Zeitpunkten über vier Tage bestätigt und quantifiziert. Während der gesamten Kultivierungszeit wurden in D12-Mutanten mindestens doppelt so viele PHB Granula je Bakterium gezählt als bei Wildtypbakterien: *lpg2316/17* Mutanten enthielten zwischen 0,8 Granula/Bakterium (Tag 1) und 1,2 Granula/Bakterium (Tag 5). *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtyp Bakterien enthielten dagegen zwischen 0,35 PHB Granula/Bakterium (Tag 1) und 0,6 Granula/Bakterium (Tag 5).

Da in der Auszählung der Granula nur die Menge an PHB Einschlüssen, nicht aber der PHB Gehalt beider Stämme verglichen wurde, kam zusätzlich die FTIR Spektroskopie (Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie) zur Anwendung, um die PHB Menge in äquivalenten Bakterienmengen beider Stämme zu vergleichen (Abb. 4.49). Die FTIR-Messungen zeigten, dass Mutante D12 einen höheren PHB Gehalt besaß als der Wildtypstamm (je Zeitpunkt ca. 0.05 Absorbance Units mehr als *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtyp). Interessanterweise besaß der Komplementationsstamm D12(pPA49), der *lpg2316/17* *in trans* auf dem *high-copy* Vektor pBCKS enthielt, annähernd keine intrazellulären PHB Speicher. Als Ursache ist daher die im Vergleich zu Wildtypbedingungen höhere Proteindosis, welche sich vermutlich aufgrund der hohen Kopienzahl des Plasmids im Bakterium ergibt, wahrscheinlich.

Ergebnisse

Die Ergebnisse der FTIR-Messungen, und die Tatsache, dass Mutante D12 mehr PHB Granula je Bakterium enthielt als der Wildtypstamm, bestätigte die Rolle des Operons *lpg2316/17* im PHB Stoffwechsel von *L. pneumophila*.

Nach James et al. (1999) fördert die Präsenz von intrazellulären PHB Speichern das Langzeitüberleben von *L. pneumophila* in kultivierbarer Form (116). Da sich der PHB Gehalt von Mutante D12 und *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtyp wie oben gezeigt unterschied, wurde dieser Zusammenhang phänotypisch untersucht.

Aus den Dauerkulturen für die Zählung der intrazellulären PHB Speicher wurden in 24h Intervallen Aliquots auf BCYE Agar ausplattiert und die Zahl kultivierbarer Bakterien bestimmt. Dabei zeigte sich, dass bei konstanter Kulturdichte die Zahl kultivierbarer D12 Mutanten schneller abnahm als dies beim Wildtypstamm der Fall war (Abb. 4.50). Bereits an Tag 2 betrug die Zahl kultivierbarer D12 Mutanten lediglich 47% der am Tag 1 ermittelten Bakterienzahl, wo hingegen 85% der Wildtypbakterien in kultivierbarer Form vorlagen. Am dritten Inkubationstag waren noch 40% der Wildtypbakterien auf BCYE Agar anziehbar und nur 18% der D12 Mutante. An Tag 5 waren keine D12 Mutanten mehr in kultivierbarer Form vorhanden, 0,01% der an Tag 1 gezählten Wildtypbakterien waren noch auf dem Agar anziehbar (Abb. 4.50).

Ergebnisse

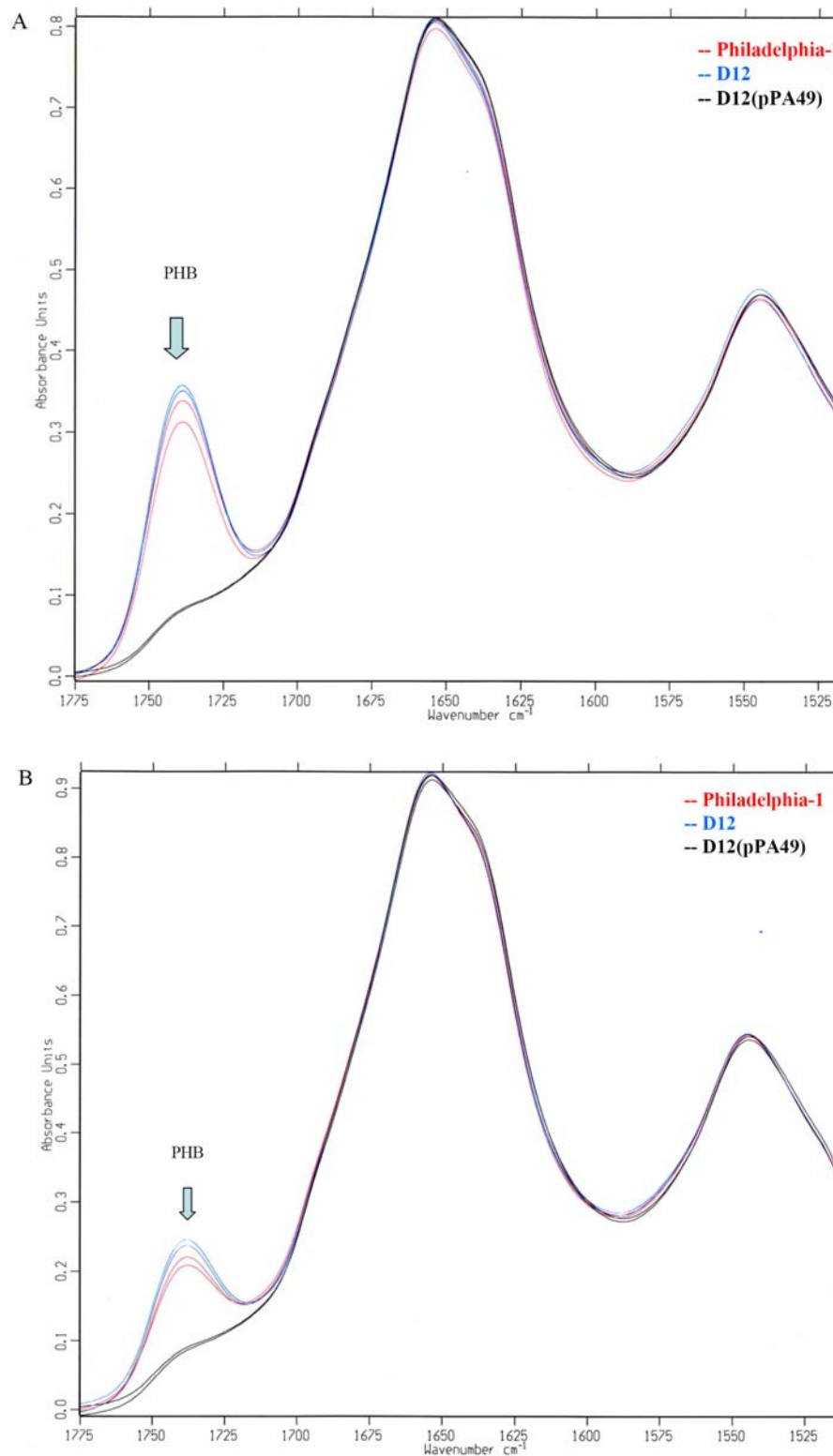


Abb. 4.49 Infrarot Spektren von *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtyp im Vergleich zur Mutante D12 und dem Komplementationsstamm. Mutante D12 (*lpg2316/17*-) enthält weniger PHB als der Wildtypstamm, der Komplementationsstamm D12(pPA49) (*pBCKS+lpg2316+lpg2317*) enthält annähernd kein PHB. (A) Spektrum nach 72h- (B) Spektrum nach 120h Anzucht auf BCYE Agar. Rot: Wildtyp Philadelphia-1, Blau: Mutante D12, Schwarz: Komplementante D12(pPA49). Je Stamm zwei unabhängige Messungen.

Ergebnisse

Die Langzeitkultivierbarkeit der D12 Mutante war im Vergleich zum *L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtypstamm reduziert. Dies könnte auf den veränderten PHB Gehalt der D12 Mutanten zurückzuführen sein. Die Rolle von *lpg2316/17* im PHB Stoffwechsel von *L. pneumophila* wird damit unterstrichen.

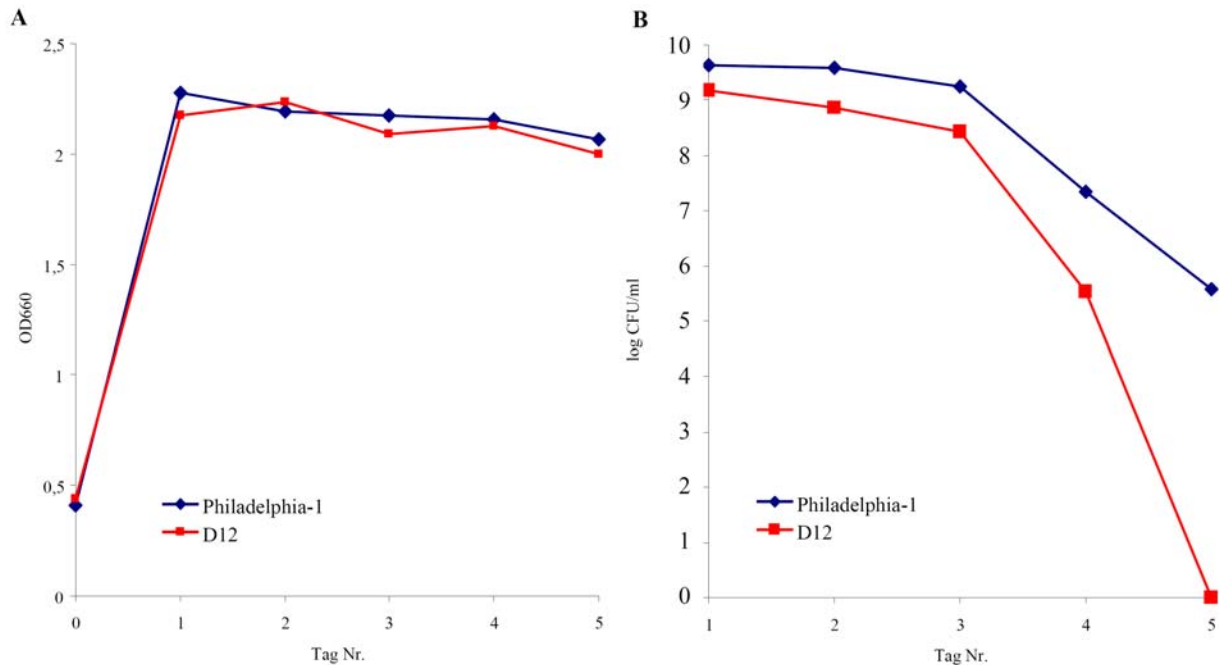


Abb. 4.50 Kulturdichte (A) und bakterielle Kultivierbarkeit (B) von *L. pneumophila* nehmen während 4 Tagen Kultivierungszeit in Flüssigmedium ab. Die Kultivierbarkeit der *L. pneumophila lpg2316/17* Mutante reduzierte sich schneller als die des Wildtypstamms, nach 4 Tagen ist die Mutante D12 vollständig unkultivierbar. Die Daten repräsentieren Doppelwerte.

4.2.7.2 Untersuchungen zur lipolytischen Aktivität von *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316/17* Mutanten

Im Abschnitt 4.1.3 wurde gezeigt, dass PatD wenn es in *E. coli* exprimiert wird, Lysophospholipase A Aktivität besitzt. Das *patD* Gen bildet zusammen mit *lpg2316* eine transkriptionelle Einheit (4.2.7). Daher war zu prüfen, ob *L. pneumophila lpg2316/17* Mutanten durch Verlust der *patD* Expression eine veränderte lipolytische Aktivität besitzen. Dazu wurde die lipolytische Aktivität von Zelllysaten 2 Tage alter *Legionella* Kulturen, die auf Agarplatten kultiviert worden waren, analysiert (Abb 4.51).

Die lipolytische Aktivität der amöbensensitiven Scattermutante D12 (*lpg2326/17*-) war im Vergleich zum Wildtypstamm stark reduziert. Dies betraf sowohl die PLA- (DPPG, DPPC) als auch die LPLA Aktivität (MPLPG, MPLPC). Die *trans*-Komplementation mit pPA49 (pBCKS+*lpg2316*+*lpg2317*) erhöhte die PLA und LPLA Aktivität von D12 auf (über) Wildtypniveau.

Ergebnisse

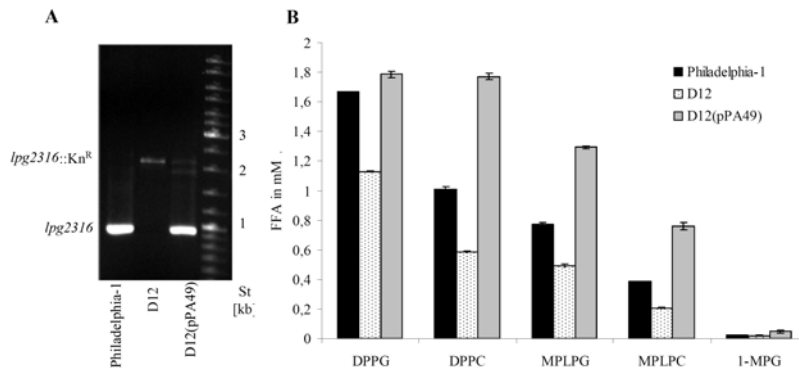


Abb. 4.51 *L. pneumophila* D12 besitzt reduzierte PLA und LPLA Aktivität. (A) PCR mit *lpg2316* spezifischen Primern (*L. pneumophila* Philadelphia-1 Wildtypstamm, Mutante D12 sowie Mutante D12(pPA49) (pBCKS+*lpg2316*+*lpg2317*) (=Komplementante). Mutante D12 zeigt Bandenverschiebung aufgrund der Tn5 Insertion. Die *trans*-Komplementante zeigt die Bandenverschiebung durch Tn5 Insertion und die „Wildtypbande“. (B) Lipidhydrolyseassay mit PLA (DPPG, DPPC) und LPLA (MPLPG, MPLPC) Substraten sowie 1-MPG (Lipasesubstrat). Die Daten repräsentieren 3-fach Werte (drei Wiederholungen).

4.2.7.3 Komplementation des intrazellulären Vermehrungsdefekts von *L. pneumophila* *lpg2316/17* Mutanten.

Die Mutante D12 wurde aufgrund ihres Scatterphänotyps isoliert, der auf attenuierte Wirtszellkolonisierung und reduzierte Virulenz hindeutet. Die attenuierte intrazelluläre Replikation von D12 wurde im Amöbenmodell und im Makrophagenmodell (letzteres nicht gezeigt) bestätigt und quantifiziert. Durch *trans*-Komplementation mit pPA49 (pBCKS+*lpg2316*+*lpg2317*) wurde die reduzierte lipolytischen Aktivität und auch die attenuierte intrazelluläre Vermehrung im Amöbeninfektionsmodell der Mutante D12 wieder hergestellt (Abb. 4.52).

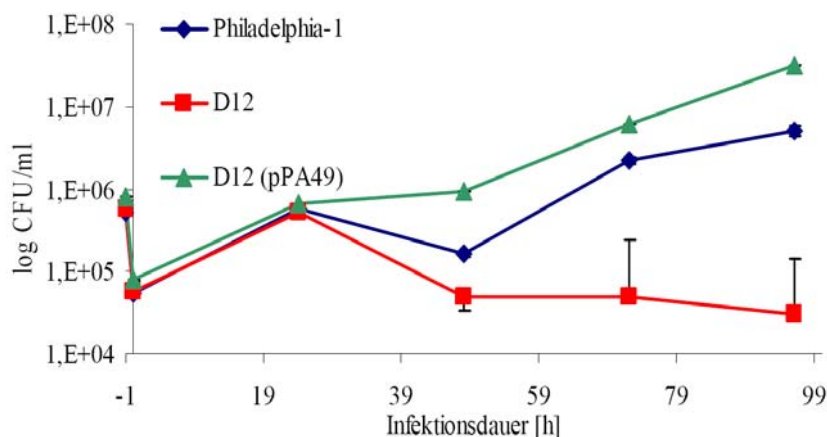


Abb. 4.52 Die attenuierte intrazelluläre Vermehrung von *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316/17*- (D12) wurde durch Einbringen von pPA49 (pBCKS+*lpg2316*+*lpg2317*) *in trans* komplementiert. Die Daten repräsentieren Doppelwerte (drei Wiederholungen).

Ergebnisse

Nachdem die Phänotypen „reduzierte lipolytische Aktivität“ und „attenuierte intrazelluläre Replikation“ der Scattermutante D12 untersucht und komplementiert worden waren, wurde abschliessend untersucht, ob auch die Amöbensensitivität von D12 auf Agarplatten (auf Grund derer die Mutante im Scattertest isoliert worden war) durch *trans*-Komplementation wieder reduziert wurde.

Hierzu wurde mit der Mutante D12 sowie mit der Komplementante D12(pPA49) in jeweils Reinkulturen erneut ein Scattertest durchgeführt und so die vollständige Wiederherstellung der Mutante D12 auf den Wildtypzustand bestätigt (Abb. 4.53).

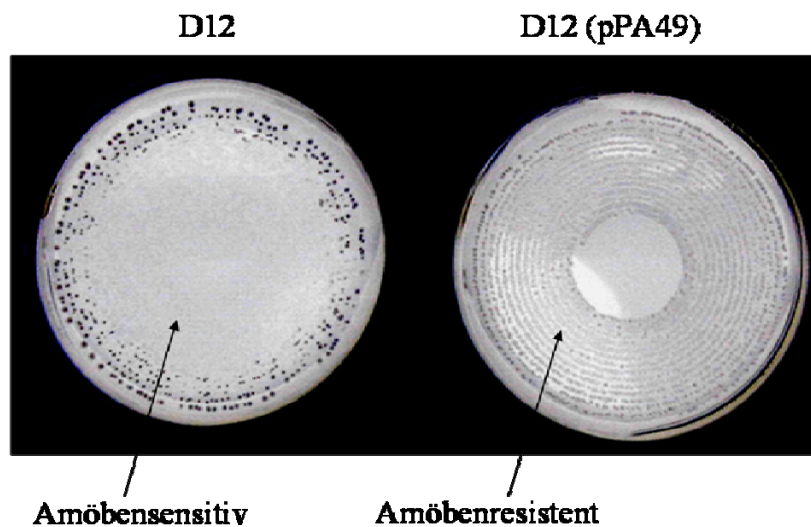


Abb. 4.53 *L. pneumophila* Philadelphia-1 *lpg2316/17* Mutanten (D12) sind im Scattertest amöbensensitiv, die Kolonien der Komplementante D12 (pPA49) sind amöbenresistent. Kolonien der Mutante werden von den Amöben dezimiert (linkes Bild), die Kolonien des Komplementationsstammes werden nicht dezimiert (rechtes Bild) (drei Wiederholungen).

Das in dieser Arbeit entwickelte Testsystem zur Detektion kolonisations- bzw. virulenzassoziierter *L. pneumophila* Gene wurde durch die Ergebnisse des durchgeführten Screens als funktionell bestätigt. Es wurden 112 Mutanten isoliert, die in 89 verschiedenen Genen eine Transposon-Insertion trugen und in Infektionsmodellen nicht- oder stark eingeschränkt replizierten. 19 der identifizierten Gene sind in der Literatur bereits als kritisch für die Wirtszellkolonisierung oder Virulenz des Erregers etabliert und bestätigen die Funktionalität des Scatterscreens. 70 neue putative *L. pneumophila* Kolonisations- bzw. Virulenzgene wurden detektiert. Eines dieser Gene, *lpg2316*, bildet zusammen mit einem PLP Gen (*patD*) ein Operon und spielt eine Rolle im PHB Stoffwechsel des Bakteriums.

5. Diskussion

5.1 Untersuchung der Patatin-ähnlichen Proteine von *Legionella pneumophila*

5.1.1 Lipolytische Aktivität

Bei der Datenbankrecherche nach putativen Phospholipasen A in bakteriellen Genomen stellte sich heraus, dass eine bisher fast unbeachtete Gruppe von Enzymen, die Ähnlichkeit mit pflanzlichem Patatin besitzt, in sehr vielen Genomen - dort oft in mehreren Paralogen, konserviert vorliegt. Interessanterweise korreliert die Anzahl von PLP Genen in den bakteriellen Genomen mit der Lebensweise ihrer Träger. Pathogene oder symbiontische Bakterien, also eng mit höheren Lebewesen assoziierte, besitzen die höchste Zahl von PLPs in ihren Genomen. Das weist darauf hin, dass diese Proteine an der Etablierung der Pathogen-Wirt- oder der symbiontischen Beziehung beteiligt sein könnten. Die vier *L. pneumophila* Sg1 Stämme Philadelphia-1, Lens, Paris und Corby sind von allen sequenzierten Bakterien diejenigen mit der höchsten absoluten (10 bzw. 11 Gene) und auch relativen (3,12 bis 3,74 PLP je 1000 Protein kodierenden Genen) Anzahl von PLP Genen (15).

Da *L. pneumophila* mindestens vier weitere phospholipolytische Enzyme besitzt (PlaA, PlaB, PlaC, PlaD), stellt sich die Frage welche Rolle die Proteine bei der Wirts(zell)ausbeutung durch das intrazelluläre Pathogen spielen.

Im Vorfeld dieser Arbeit existierten keine experimentell fundierten Daten bezüglich der biochemischen Aktivität und Funktion der *L. pneumophila* PLP.

In silico Studien und die Expressionsstudien aus dieser Arbeit sowie von Brüggemann et al. weisen auf eine funktionelle Individualität der PLP innerhalb von *L. pneumophila* hin (29). Die Computervoraussage der subzellulären Lokalisation der PLP innerhalb *L. pneumophila* mittels PSORTb (www.psort.org) variiert zwischen den 11 Genen. PatD, E, I, J, K werden als Zytoplasmamembran-ständig vorausgesagt, wohingegen für PatH zytoplasmatische Lokalisation vorhergesagt wird. Für PatF wird eine vermutliche Verankerung in der äusseren Membran ausgegeben. VanRheenen et al. zeigten experimentell das PatC (VpdA) und PatG (VpdB), genau wie PatA (VipD), über das *L. pneumophila* Dot/Icm TypIVB-Sekretionssystem in Wirtszellen eingeschleusst werden (228). In der vorliegenden Arbeit wurde demonstriert, dass PatA in der stationären, virulenten Wachstumsphase von *L. pneumophila* stark induziert exprimiert wird. Dasselbe gilt für PatD, PatE und PatI, wie Brüggemann et al. im Amöbeninfektionsmodell fanden (29).

Die aus diesen Daten abzuleitende molekulare Individualität der einzelnen PLP lässt die Vermutung zu, dass *L. pneumophila* PLPs kodiert, die verschiedenen äusseren Parametern

Diskussion

und Lebensstadien angepasst sind. Dies könnte dem Bakterium erlauben, sich einer gegebenen Situation optimal anzupassen bzw. adäquat auf Verteidigungsstrategien unterschiedlicher Wirtszellen zu reagieren. Die Tatsache, dass *L. pneumophila* in der Lage ist, mindestens 16 verschiedene Amöbenspezies sowie mindestens 16 verschiedene Säugerzelllinien (67) zu infizieren (dazu kommen extrazelluläre Lebensstadien in terrestrischen oder aquatischen Lebensräumen), unterstreicht die Notwendigkeit funktioneller Adaptationsstrategien. Zusätzlich könnte die genetische Variabilität von *L. pneumophila* die Akkumulation von Genen begünstigen, die eventuell mutierte Paraloge substituieren. In *Candida albicans* wurde ebenfalls eine Reihe von 10 Enzymen (Aspartat-Proteasen) identifiziert, die die Virulenz der pathogenen Hefe entscheidend beeinflussen. Die Studie von Naglik et al. zeigt, dass pH Optima, Substratspezifitäten und Expressionsphasen der einzelnen Proteine variieren, was auch hier deren spezialisierten Einsatz zu verschiedenen Lebens- und Wirtszellinfektionsphasen vermuten liess (158). Im *L. pneumophila* Genom finden sich weitere Beispiele vielfach vorhandener Proteine, so existieren mehrere Paraloge der Sid oder Enh Proteine. Auch diese sind - wie die PLP Gene - nicht grundsätzlich simultan transkribiert (29,35,38,39,138).

Zur Untersuchung der putativen lipolytischen Aktivität wurden die 11 *L. pneumophila* Philadelphia-1 PLP Gene (*patA* bis *patK*) in *E. coli* exprimiert und deren Aktivität in Zelllysaten bestimmt. Das PLP PatA wurde rekombinant aufgereinigt und Lipidhydrolysetests unterzogen. Dabei wurde auch getestet, ob die enzymatische Aktivität durch bakterielle oder eukaryontische Kofaktoren veränderbar ist, und ob das Fehlen des *patA* Gens in den lipolytischen Eigenschaften entsprechender *L. pneumophila knockout* Mutanten nachzuvollziehen ist. Zusätzlich wurde ein rekombinant aufgereinigtes PLP eines anderen Bakteriums (*E. coli* RssA) untersucht und dessen lipolytische Aktivität bestimmt.

Im Ergebnis dieser Studie zeigt sich, dass alle 11 *L. pneumophila* PLP, exprimiert in *E. coli*, Lysophospholipase A-Aktivität besitzen (siehe 4.1.4).

Interessanterweise zeigte rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes PatA Protein zusätzlich eine geringe PLA Aktivität gegen das Diazyl-Phospholipid DPPG, welche bei der Testung von PatA exprimierenden *E. coli* Zelllysaten nicht nachweisbar war. Es ist möglich, dass die DPPG spezifische PLA Aktivität von PatA in den Tests der *E. coli* Expressionsklone durch andere Aktivitäten, z.B. Azyltransferaseaktivität oder Inhibitoren, überdeckt bzw. blockiert wurde. Deshalb ist nicht auszuschliessen, dass auch die anderen PLP in aufgereinigter Form PLA Aktivität zeigen. Für zukünftige Untersuchungen ist es daher von Interesse die 10 weiteren *L. pneumophila* PLP Proteine in aufgereinigter Form ohne den *E. coli* Hintergrund auf lipolytische Aktivität zu testen. Das aufgereinigte *E. coli* PLP RssA wurde in den Lipidhydrolysetests ebenfalls als PLA identifiziert, jedoch spaltete RssA im Gegensatz zu PatA hauptsächlich vom Diazyl-Phospholipid DPPG Fettsäuren ab, war aber

Diskussion

nicht in der Lage Monoazyl-Phospholipide zu deazylieren. Für die lipolytischen Aktivitäten von PatA und RssA waren die katalytisch aktiven Serinreste (S73 bzw. S41) im aktiven Zentrum G-X-S-X-G essentiell, wie Experimente mit Proteinen gezeigt haben, die ein mutiertes Lipasemotiv trugen. Die ohne Kofaktorbindung vorhandene Aktivität von *L. pneumophila* PatA war durch Präinkubation des Proteins mit Bakterien- oder Zelllysaten nicht veränder- oder aktivierbar. PatA benötigt daher für seine Aktivität vermutlich keine weiteren Kofaktoren. Die Phospholipase A-Aktivität von *L. pneumophila* PatA ist im Vergleich zu *E. coli* RssA wesentlich geringer. PatA (1nmol/ml) hydrolysierte vom Substrat DPPG 80nM/min Palmitinsäure wo hingegen RssA (1nmol/ml) 2400nM/min der Fettsäure freisetzte was der 30-fachen Menge entspricht. PatA besass vor allem LPLA Aktivität und setzte 160nM/min Palmitinsäure aus MPLPG, und 600nM/min aus MPLPC frei. *P. aeruginosa* ExoU, welches über ein Typ III-Proteinsekretionssystem in Wirtszellen injiziert wird, besitzt nach Aktivierung durch Bindung des eukaryontischen Kofaktors Superoxiddismutase 1 (SOD1) LPLA und PLA Aktivität (194). Die lipolytische Aktivität von *P. aeruginosa* ExoU wurde *in vitro* mit den Substraten DPPC, MPLPC untersucht (221) und ist nach der Aktivierung durch SOD1 hauptsächlich gegen Lysophospholipide gerichtet, ExoU besitzt aber auch PLA Aktivität, die ca. 10% der LPLA Aktivität entspricht.

Die Tatsache, dass PatA hauptsächlich LPLA Aktivität besitzt wurde in Experimenten mit *L. pneumophila patA knockout* Mutanten bestätigt, da die Mutanten signifikant reduzierte sekretierte und zellassoziierte LPLA Aktivität besaßen. Durch *trans*-Komplementation mit *patA* konnte nur die reduzierte zellassoziierte LPLA Aktivität der Mutanten wieder auf Wildtypniveau hergestellt werden (siehe 4.1.4.2). Dieses Ergebnis, und die Tatsache das die in dieser Arbeit gefundene vollständige Attenuation der *L. pneumophila patA* Mutanten nicht komplementierbar war, deuten auf eine *second site* Mutation im Genom der generierten Mutanten hin. Vermutlich befindet sich diese zweite Mutation in einem der beiden *dot/icm* Loki des Bakteriums, da das Ausschalten von Komponenten dieses Systems zur Avirulenz des Bakterium führt und auch die reduzierte, aber nicht komplementierbare, sekretierte LPLA Aktivität des Komplementationsstamms erklären könnte.

Da alle 10 *L. pneumophila* PatA Paraloge Patatindomänen tragen, ist es wahrscheinlich, dass die Rolle dieser Enzyme für *Legionella* von ihrer Phospholipaseaktivität abhängt. Da PatA Phospholipase A-Aktivität gegenüber Lipiden besitzt, die in Biomembranen sowie im Lungensurfactant (dem Phospholipidmonolayer, der die Lungenblässchen auskleidet) abundant vorkommen, ist es auch möglich, dass die Rolle der PLP in einer Lebens- bzw. Infektionsphase des Bakteriums benötigt werden, die in unseren Assays nicht repräsentiert wurde, z.B. während der Zerstörung von Lungensurfactant, einem zentralen Element der Legionärerkrankung (70).

5.1.2 Lokalisation und Funktion von PatA für das Bakterium bzw. bei der Infektion von Wirtszellen

5.1.2.1 Die Rolle der lipolytischen Aktivität

Für diese Arbeit wurden insgesamt vier mal unabhängig *L. pneumophila patA* Mutanten in zwei verschiedenen Stämmen, Philadelphia-1 und 130b generiert. In jedem der Fälle zeigten sich die Mutanten in ihrer intrazellulären Replikation attenuiert, konnten jedoch durch Einbringen des Wildtypgens nicht komplementiert werden. Dies impliziert, dass der *knockout* von *L. pneumophila* PatA entweder einen irreversiblen Sekundäreffekt auf die Infektiosität des Bakteriums hat, oder dass *L. pneumophila patA* Mutanten eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber *second site* Mutationen besitzen. Interessanterweise deckt sich diese Erfahrung mit der zweier anderer Labore, in denen PatA (dort VipD genannt) untersucht wurde (211,228). Auch hier wird von einer Häufung apathogener und nicht-komplementierbarer *L. pneumophila patA* Mutanten berichtet, obwohl schliesslich *L. pneumophila* LP02 (ein Philadelphia-1 Derivat) *patA* Mutanten generiert werden können, die nicht in ihrer Virulenz attenuiert sind. VanRheenen et al. schalten ebenfalls die Gene *vpdA/patC*, *vpdB/patG* und *vpdC/patF* aus, was die Virulenz des Bakteriums nicht beeinflusst (228). Angesichts der hohen Zahl von 11 homologen PLP Genen erscheint es jedoch nicht verwunderlich, dass der *knockout* eines einzelnen oder sogar mehrerer dieser Gene nicht zu einem Verlust der Virulenz eines Erregers führt. Die Tatsache des in der vorliegenden Arbeit gezeigten reduzierten Hämolysevermögens von *L. pneumophila patA knockout* Mutanten, welches durch Einbringen des Gens *in trans* komplementiert werden konnte, spricht dafür, dass PatA zu der Lungenzellzerstörung durch *L. pneumophila* beitragen könnte. Bemerkenswert ist, dass sich die in den Laborversuchen ermittelte Hauptaktivität von PatA nicht gegen typisch in Eukaryonten vorkommende Lipide (wie DPPC) richtet, sondern bevorzugt gegen MPLPG und DPPG. Die bevorzugten Substrate von PatA, kommen im Menschen vor allem im Lungensurfactant abundant vor (dort 7% DPPG) (94). Dies untermauert zusätzlich dessen mögliche Rolle bei der Zerstörung der Lungenfunktion.

Obwohl schon mehrere bakterielle und eukaryontische PLAs mit zytolytischer und hämolytischer Aktivität charakterisiert wurden, existieren wenig Daten über *in vivo* Effekte. Für das *P. aeruginosa* PLP ExoU, sowie die Gruppe A Streptokokken (GAS) PLA, SlaA, wurde eine unmittelbare Rolle in der Wirts-Pathogen Interaktion beschrieben (203,212). Die Präsenz beider Effektoren geht mit signifikanten *in vivo* Effekten einher und korreliert direkt mit der Virulenz und Wirtszellkolonisation der Bakterien. GAS SlaA Mutanten sind signifikant weniger adhärent, weniger zytotoxisch und haben eine reduzierte Virulenz im Mausmodell (212). *P. aeruginosa* ExoU ist das einzige bisher umfassend charakterisierte bakterielle PLP und besitzt strukturelle Ähnlichkeiten zu *L. pneumophila* PatA. ExoU

versusacht durch seine starke und PLA abhängige Zytotoxizität Epithelzerstörung *in vitro* und in Tiermodellen (Kaninchen, Maus). Es trägt dadurch, und auch durch die Aktivierung proinflammatorischer Zytokine zur Etablierung und Ausbreitung von *P. aeruginosa* innerhalb des Menschen bei (50,147,169,191). Dementsprechend zeichnen sich ExoU-negative *P. aeruginosa* Stämme durch wesentlich mildere Krankheitsverläufe im Menschen aus (98,187). Interessant in Zusammenhang mit dem von Shohdy et al. für PatA demonstrierten *vps*-Phänotyp in Hefe (siehe auch 5.1.2), der zur Fehlverteilung von späten sekretorischen Vesikeln führt (211), sind zwei Studien die belegen, dass die eukaryontische zytosolische Phospholipase A₂ (cPLA₂) an der Regulation des intrazellulären Membran-Proteintransports beteiligt ist. De Figueiredo et al. (1998) zeigten, dass PLA₂ Antagonisten in der Lage sind den retrograden Proteintransport von Golgi Apparat zum ER zu inhibieren (53). Die Überexpression von cPLA₂ führt in renalen Epithelzellen zu einer Fehlverteilung normalerweise kondensiert im Golgiapparat vorliegender membranständiger Proteine (β-COP, Giantin) und inhibiert den Transport von Aquaporin-2 zur Plasmamembran (41). Obwohl der von PatA verursachte *vps*- Phänotyp bei Shohdy et al. unabhängig von der Patationdomäne, und daher der PLA Aktivität der Proteins beschrieben wurde (211), und auch in der vorliegenden Arbeit die Unabhängigkeit der PatA-Membranlokalisation von der PLA Aktivität gezeigt wurde (siehe 4.1.6.1), sollte doch die Kenntnis der möglichen Rolle der PLA₂ in der Manipulation des Wirtszell-Proteintransports nicht außer Acht gelassen werden. Sowohl bei Shohdy et al., als auch in der vorliegenden Arbeit wurde mit transfizierten Zellen gearbeitet, deren Phänotypen nicht notwendigerweise die Vorgänge widerspiegeln, die bei Injektion des Proteins durch *Legionella* ablaufen.

5.1.2.2 Die Rolle von PatA-Lokalisation und C-terminaler Extension

Wie in dieser Arbeit erstmalig gezeigt, befindet sich der zelluläre Wirkort von PatA in der eukaryontischen Wirtszelle an oder in dichter Nähe der Zytoplasmamembran, wie Kolokalisationsstudien mit E-Cadherin zeigten. Cadherine sind Zelladhäsionsmoleküle, die in der Zytoplasmamembran von Eukaryonten verankert sind. Die membranständige Lokalisation von PatA und das Wissen um die PLA/LPLA Aktivität des Enzyms zeigen, dass sich das Protein nach Injektion in die Wirtszelle in Regionen, die reich an Phospholipiden sind, also in Substratnähe aufhält. Dazu kommt, dass PatA hämolytische und zytotoxische Eigenschaften besitzt. Diese zeigten sich zum Beispiel darin, dass die in dieser Studie verwendeten A549 Epithelzellen, die das Wildtypprotein PatA exprimierten, in der Regel abgerundet und insgesamt gestresst aussahen, die *active site* Mutante PatAS73A jedoch in grösseren Mengen toleriert wurde. Der Studie von Shohdy et al. ist – wie bereits erwähnt - zu entnehmen, dass die Expression von PatA Teile des sekretorischen Weges in Hefe unterbricht (*vps*- Phänotyp), wodurch Proteine fehlgeleitet werden. Dieser Effekt existiert in transfizierten

Hefezellen aber unabhängig von der PLA Aktivität des Proteins, wie Experimente nur mit der C-terminalen Proteinhälfte, welche keine Patatin Domäne trägt, gezeigt haben (211).

P. aeruginosa ExoU trägt - wie PatA - auf der N-terminalen Proteinhälfte eine Patatindomäne und verfügt über eine C-terminale Verlängerung von ungefähr 300 Aminosäuren über die Patatindomäne hinaus. Die Proteine haben deshalb - wie auch weitere PLP - eine zweiteilige Struktur. Im Gegensatz zu PatA, dessen *vps*- Phänotyp unabhängig vom N-Terminus induziert wird, ist für die Toxizität von ExoU neben den aktiven und N-terminal lokalisierten Resten (S142 und D344) der Patatindomäne zusätzlich der C-Terminus von entscheidender Bedeutung (68,69). Stirling et al. identifizierten 5 C-terminal lokalisierte Aminosäuren von *P. aeruginosa* ExoU (As 679 bis 683), die sowohl für PLA- Aktivität, Zytotoxizität und Membranlokalisation des Effektors essentiell sind (175,216). So wie die gesamte ca. 300 Aminosäuren umfassende C-terminale Region von ExoU nicht in *L. pneumophila* PatA konserviert ist (d.h. es liegt keine Proteinhomologie vor), so sind auch diese 5 Aminosäuren (KAWRN) nicht in PatA vorhanden. Interessanterweise deuten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, sowie die Studie von Shohdy et al. trotzdem auf eine wichtige Rolle des PatA C-Terminus für die Manipulation der Wirtszelle hin. Obwohl der PatA C-Terminus keine bekannten Lipidbindedomänen besitzt (112), als auch sonstige Motive fehlen, die auf Interaktion mit zum Beispiel anderen membranständigen Proteinen der Wirtszelle hinweisen, zeigte sich, dass die Präsenz des C-Terminus für die periphere, wahrscheinlich membranständige Lokalisation von PatA in eukaryonten A549 Epithelzellen wichtig ist. Die verkürzte PatA Version PatAK492Stop wurde in A549 Zellen exprimiert und zeigte keine membranständige, sondern eine zytoplasmatische granulöse Lokalisation in den Zellen (siehe 4.1.6.1). Lipidhydrolysetests mit Bakterienzelllysaten die PatA oder PatAK492Stop enthielten, zeigten, dass die PLA-Aktivität des Proteins zum Teil von der Präsenz des C-Terminus abhängig ist; da die Aktivität gegenüber Lysophospholipiden reduziert, aber nicht vollständig unterbunden wurde wenn die verkürzte Version exprimiert wurde (Daten nicht gezeigt). Durch zukünftige Untersuchungen der Proteinstruktur wäre zu klären, ob dies auf Konformationsänderungen der Sekundär- oder Tertiärstruktur von PatA zurück zu führen ist, oder ob biochemische Zusammenhänge der Katalyse hier entscheidend sind.

Wurden nur die C-terminalen 129 Aminosäuren N-terminal mit GFP fusioniert und in den Zellen exprimiert, so waren diese nicht ausschliesslich membranständig lokalisiert. Das deutet darauf hin, dass entweder die N-terminale Proteinregion die intrazelluläre Lokalisation des Proteins mitbeeinflusst oder die Toxizität des C-Terminus dessen veränderte Lokalisation bei Fehlen des N-Terminus bewirkt. Letzteres erscheint aber vor dem Hintergrund von ExoU unwahrscheinlich. Dessen C-Terminus ist, trotz fehlender Homologie, ebenfalls für die membranständige Lokalisation des Effektors essentiell. Allerdings lokalisiert auch in diesem Fall die C-terminale Proteinhälfte, ohne den N-terminalen Proteinteil exprimiert, nicht

membranständig, ist aber gleichzeitig für die PLA Aktivität entscheidend, die die Zytotoxizität von ExoU bedingt. Der von Shohdy et al. beschriebene, durch den C-Terminus von PatA induzierte, *vps*- Phänotyp, der in Hefe relativ gut toleriert wurde (211), konnte in unseren Experimenten insofern nachvollzogen werden, als dass A549 Zellen, die nur die C-terminalen 129 Aminosäuren von PatA exprimierten, dieses schlechter tolerierten als Zellen, die das Gesamtprotein exprimierten. Dies zeigte sich in einem schlechten Allgemeinzustand der Zellen, verbunden mit Nekrose- (verwaschene Zellkerne, aufgeblähte Zellen) und Apoptosezeichen (Zellkondensation, kondensierte Zellkerne).

Die Membranlokalisierung von Phospholipasen und anderen sekretierten Effektoren wurde bereits in mehreren Studien gefunden und untersucht. Zum Beispiel bindet humane cPLA₂ (zytosolische Phospholipase A₂) an Lipidmembranen in Folge eines Anstiegs der zellulären Kalziumkonzentration (eine generelle Reaktion auf Stressoren und ein wichtiger Regulator der Phagozytose). Das führt schliesslich zur Freisetzung von Arachidonsäure (in Folge dessen Synthese von Prostaglandinen und Eicosanoiden) und Lysophospholipiden (Synthese von Plättchenaktivierendem Faktor, *platelet activating factor*, PAF) und stimuliert die Entzündungsreaktion (113,159,192).

Die *Salmonella typhimurium* Typ III sekretierten Effektoren SopE, SopE2, SopB, SptP, SipA, SipC und SspC sind nach der Injektion in der Zytoplasmamembran der Zielzelle lokalisiert und führen dort auch ihre Funktion aus (33,198,222). SipA und SipC zum Beispiel beeinflussen kooperativ in der Zytoplasmamembran die Wirtszell-Aktinpolymerisation, die für die phagozytotische Aufnahme der Bakterien notwendig ist (33,146). Weitere Beispiele für Wirtszellmembran-ständige Effektoren sind *Yersinia* YpkA (92) und EPEC Tir (119). Auch ExoU, eine Patatin-ähnliche Phospholipase A von *P. aeruginosa*, ist in der Plasmamembran lokalisiert nachdem es vom Typ III Sekretionssystem in die Zielzelle injiziert wurde (169,175) und ist hier in entscheidender Weise an der Arachidonsäurefreisetzung und schliesslich Stimulation proinflammatorischer Eicosanoide beteiligt (191). Das Vermögen von PatA, die proinflammatorische Zytokinproduktion zu stimulieren, wurde (insbesondere wegen der Komplementationsprobleme der *L. pneumophila patA* Mutanten) noch nicht untersucht. Es ist durchaus anzunehmen, dass PatA in der Lage ist, Arachidonsäure unter *in vivo* Bedingungen aus Membranen frei zu setzen, da das Protein in Membrannähe lokalisiert ist und PLA Aktivität besitzt. Diese Hypothese bietet auch funktionelle Erklärungen für die zweigeteilte Struktur des Proteins. Da die C-terminale Region in den Vesikeltransport der Wirtszelle eingreift, könnte eine Rolle des N-Terminus neben dessen membranlytischen Fähigkeiten in der Arachidonsäurefreisetzung und damit Stimulation der Entzündungsreaktion liegen.

Für zukünftige Arbeiten wäre die Testung der 11 *L. pneumophila* PLP in diesem Sinne von grossem Interesse. Allerdings ist fraglich, ob bei der grossen PLP Anzahl in *L. pneumophila*

durch den *knockout* von einem oder mehreren Genen überhaupt ein detektierbarer Effekt entsteht.

5.2 Suche und Identifizierung neuer *Legionella* Wirtszellkolonisationsgene

5.2.1 Zweck und Entwicklung eines neuen Detektionssystems für Wirtszellkolonisationsgene

Legionellen sind als Umweltkeime in der Lage intrazellulär Amöben zu parasitieren, sich zu vermehren und schliesslich die Wirtszelle zu verlassen, welche dabei zerstört werden kann. Geht dem Parasiten eine für die Interaktion mit der Wirtszelle wichtige Eigenschaft verloren, beispielsweise durch *knockout* eines Gens, so ist er nicht mehr in der Lage, die Wirt-Parasit Beziehung zu seinen Gunsten aufzubauen. Stattdessen wird er vom Wirt, z.B. räuberischen Amöben, aufgenommen und verdaut. Dieses ist für die Komponenten des Dot/Icm Typ IVb Proteinsekretionssystem von *L. pneumophila* der Fall, dessen Verlust dazu führt, dass die Bakterien weder in Amöben noch humanen Zellen überleben oder sich gar vermehren können (204,231). Um Amöben zu parasitieren, ist als erster Schritt die Kolonisation der zukünftigen Wirtszellen notwendig. Kann eine Wirtszelle nicht oder nur unzureichend von Legionellen kolonisiert werden, z.B. durch Verlust von bakteriellen Adhäsinen, Invasinen, Sekretionssystemen und deren Effektoren, wird keine intrazelluläre Replikation der Bakterien erfolgen, die gleichzeitig die Kerneigenschaft (human-) pathogener Legionellen darstellt. Die Untersuchung der Interaktion, bzw. von Interaktionsdefekten von *L. pneumophila* mit Amöben (z.B. *A. castellanii*) ist von grösstem Interesse, da sich viele Aspekte der Amöbeninfektion und der Infektion humaner Zellen stark ähneln. In beiden Fällen replizieren die Bakterien innerhalb eines Phagosoms, welches von Vesikeln und ER Membran umringt ist (1,81,220). Charakteristischerweise entgeht das legionellenhaltige Phagosom (LCV) zunächst der Ansäuerung sowie der Verschmelzung mit primären Lysosomen (24,107). Aber nicht nur die Vorgänge in den Wirtszellen ähneln sich, auch die bakteriellen Determinanten zur Etablierung der Parasit-Wirt-Interaktion überlappen zum grossen Teil bei der Infektion beider Zelltypen (81). RtxA, das porenbildende *Legionella* „repeats in structural“-Toxin, ist an Adhärenz, Zytotoxizität und am Eintritt der Bakterien in Wirtszellen beteiligt und wurde als wichtige Virulenzdeterminante in humanen Zellen, in *A. castellanii* und im Mausmodell identifiziert (45-47). Das flagelläre Motorprotein FlhA, LigA – das „*Legionella infectivity Gen A*“ und EnhC sind weitere Beispiele für *Legionella* Proteine, die an der erfolgreichen Besiedlung von Wirtszellen beteiligt sind (46,56,66). Auf der anderen Seite existieren auch Virulenzproteine, die spezifisch für einen Wirtszelltyp sind. Gao *et al.* identifizierten 32 *mil* Loki (*mil*= *macrophage specific infectivity loci*), die für die Zytopathogenität und das intrazelluläre Überleben bzw. die intrazelluläre Replikation von *L. pneumophila* in humanen

U937 Makrophagen von grosser Wichtigkeit sind, bei der Infektion von Protozoen jedoch vernachlässigbar waren (82).

Viele Aspekte der Amöben/Wirtszellinfektion durch Legionellen sind noch immer unklar. Daher besteht die Notwendigkeit, weitere Virulenzfaktoren des Bakteriums und deren Wirkmechanismen umfassend und effektiv zu identifizieren. Bisherige Testsysteme für die Virulenz einzelner *Legionella* Mutanten waren stets auf die Durchführung von Koinfektionen der Bakterien mit Wirtszellen angewiesen. Das macht diese Systeme sehr Material- und vor allem zeitaufwändig. Daher war die Anzahl analysierbarer *Legionella* Klone stets limitiert. Im Screen von Gao *et al.* wurden 5.280 Klone einer mini-Tn10::kn^R mutagenisierten *L. pneumophila* AA100 Klonbank auf Defekte in der Interaktion mit U937 Makrophagen und *A. polyphaga* untersucht und insgesamt 89 Mutanten (deren Identität nicht benannt wurde) gefunden, die reduzierte Zytotoxizität, verringertes intrazelluläres Überleben und reduzierte intrazelluläre Replikation in beiden Wirtszelltypen besaßen (81). Polesky *et al.* untersuchten 700 „signature tagged“ *L. pneumophila* 130b Insertionsmutanten auf Replikationsdefekte im *A. castellanii* Infektionsmodell. In der Studie wurden sechs Mutanten mit Defekten in der Invasion und intrazellulären Replikation in *A. castellanii* identifiziert. Zwei der Mutanten trugen Insertionen in bekannten *L. pneumophila* Virulenz-Genen, *lspK* (Struktur-Gen des TypII Sekretionssystems Lsp) und *aroB* (Stoffwechselgen, Biosynthese aromatischer Aminosäuren). Die verbleibenden vier Mutanten trugen Insertionen in Genen, die in *L. pneumophila* noch nicht charakterisiert waren: ein Gen besass Homologie zu einem Zytochrom C Biogenese Gen von *Pseudomonas fluorescens* (*ccmF*), ein Gen zeigte Homologie zu *Vibrio cholera flrC* (einem Transkriptionsfaktor, der die Flagellenbiosynthese in *V. cholera* reguliert) und ein drittes Gen war homolog zu *Rhizobium sp.* NGR234 *traA* (involviert in DNA Transfer via Konjugation). Das vierte Gen besass keine Homologien zu bekannten Genen und wurde nicht genauer spezifiziert (171).

Aufgrund der Fülle von Genen, die auf dem *L. pneumophila* Chromosom lokalisiert sind, und wegen der teilweise ausgeprägten funktionellen Redundanz innerhalb der *L. pneumophila* Proteine werden Testsysteme benötigt, die mit geringem Arbeitsaufwand Aussagen bezüglich der Virulenz von *L. pneumophila* Stämmen zulassen und dabei eine möglichst grosse Anzahl von *L. pneumophila* Stämmen (Mutanten) erfassen können.

In dieser Arbeit wird ein neuer, agarplattenbasierter Assay (hier Scatterscreen / Scattertest benannt) vorgestellt, der genau diesen Vorzug besitzt. Er ermöglicht im Unterschied zu den vorher genannten Screens die Prüfung einer sehr großen Anzahl unterschiedlicher Mutanten auf ihre Kolonisationsfähigkeit von *A. castellanii*. Nach erfolgreicher Anwendung desselben werden isolierte Klone von Interesse in Infektionsmodellen, z.B. U937 Makrophagen oder *A. castellanii* quantitativ auf ihre intrazelluläre Replikationsfähigkeit getestet. Der Vorteil des

hier etablierten Assays im Bezug auf die biologische Relevanz der Ergebnisse liegt insbesondere darin, dass trotz der offensichtlichen experimentellen Schlichtheit und Wirtschaftlichkeit ein klares Ja / Nein-Ergebnis erzielt wird.

Im oben genannten Screen von Gao *et al.* wurde ebenfalls eine relativ hohe Zahl von *Legionella* Insertionsmutanten untersucht, allerdings in funktionell ausgerichteten Assays (Zytotoxizität, Invasivität (81)). Das hat den Vorteil, bereits im ersten Schritt eine funktionell differenzierte Aussage bezüglich der Mutante / des Gens von Interesse zu erhalten, allerdings ist – wie bereits betont - der Aufwand im Vergleich zum Scatterscreen erheblich und von anderen Labors mit anderen Organismen nur schwerlich reproduzierbar. Der Scatterscreen stellt dagegen vermutlich eine wirkungsvolle Testmethode zum Auffinden von Virulenzgenen auch in anderen Bakterien als *L. pneumophila* dar. So diente in einem vergleichbaren Testsystem *Dictiostelium discoideum* dem Auffinden von TypVI Sekretionsgenen in *Vibrio* (173) und erste vielversprechende Versuche mit *Salmonella typhimurium* lassen auf eine breite Anwendungsmöglichkeit des Testsystems schliessen (Bender, Jaschinski, Flieger unveröffentlicht).

5.2.2 Die Identifizierung vieler etablierter Virulenzgene evaluiert das Testsystem als funktionell

Im Scatterscreen von *L. pneumophila* Philadelphia-1 wurden 11.300 TN5 Insertionsmutanten, in drei unabhängigen Transpositionen generiert und auf Amöbensensitivität getestet. Dabei fanden sich 119 Mutanten ohne die dem Wildtypstamm eigene Amöbenresistenz. Sie hatten offensichtlich aufgrund der Transposoninsertion ein wichtiges Genprodukt "verloren". Erwartungsgemäss wurden beim Test sehr viele Mutanten in den *dot/icm* Loki isoliert. Das Dot/Icm TypIVB Proteinsekretionssystem ist ein essentieller *Legionella*-spezifischer Virulenzfaktor, der von 25 Genen kodiert wird. Mutationen in Genen der beiden *dot/icm* Loki führen zu attenuierter Virulenz des betroffenen Stammes (204,231). Zusätzlich wurden mit dem Scatterscreen eine Reihe von bekannten *Legionella* Virulenzgenen gefunden, darunter *rtxA* (kodiert „repeats in structural toxin A“), *fliN* (kodiert Flagellen Motorprotein), *ligA* (kodiert "*Legionella infectivity gene A*"), *rcp* (kodiert Rcp, verleiht „resistence to cationic antimicrobial peptides“), und *ptsP* (kodiert Phosphoenolpyruvat Phosphotransferase). Interessanterweise wurden zum Teil ähnliche Gene identifiziert, wie im Screen von Poleski *et al.* (171), z.B. ein Gen des Zytochrom C Stoffwechsels (*ccmH*), der Flagellierung (*fliN*) und ein Effektorproteingen des TypII Sekretionsapparates Lsp, *lapA* (kodiert eine Leucin Aminopeptidase).

Es erscheint überraschend, dass keine Mutante im zweiten wichtigen (neben Dot/Icm TypIVB) virulenzassoziierten *Legionella* Proteinsekretionssystem Lsp gefunden wurde. Eine

Diskussion

mögliche Erklärung für das Fehlen von *lsp* Mutanten könnte in den Testbedingungen zu finden sein. Möglicherweise besitzt das Typ II Sekretionssystem Lsp unter den Bedingungen des Scattertests eine solch existenzielle Wichtigkeit für *L. pneumophila*, dass bei Fehlen des funktionellen Sekretionssystems bereits das Heranwachsen von Bakterienkolonien unter dem Fraßdruck von *A. castellanii* nicht mehr erfolgen kann. Obwohl die Identifikation vieler bekannter Virulenzgene den Scatterscreen als funktionell und konsistent erwiesen haben, waren für uns die Gene von Interesse, die entweder völlig uncharakterisiert waren - oder noch nicht mit der Virulenz des Erregers in Verbindung gebracht wurden. In 76 isolierten Scattermutanten (68% der 112 isolierten, attenuierten Mutanten) waren solche Gene von der Tn5 Insertion betroffen. Werden Gene / Genprodukte primär annotiert, werden in der Regel aufgrund von Sequenz- oder Strukturhomologien putative biologische Funktionen des Genproduktes bestimmt. Auf diese Zuordnungen kann über Datenbanken, z.B. TIGR CMR zugegriffen werden. 60% der Protein-kodierenden Gene des *L. pneumophila* Chromosoms sind funktionellen Gruppen zugeordnet, 40% sind noch unklassifiziert bzw. hypothetisch (<http://cmr.jcvi.org>). Die gefundenen Gene wurden anhand der jeweiligen Primärannotationen funktionellen Gruppen (z.B. Transport und Bindung von Proteinen, DNA Metabolismus) zugeordnet. 59 der 89 verschiedenen identifizierten Gene (66%) sind funktionellen Gruppen zugeordnet. Die 30 verbleibenden nicht klassifizierten Gene entsprechen 34% der identifizierten Gene und sind daher im Vergleich zum Gesamtgenom unterrepräsentiert (dort 40% unklassifiziert, hypothetisch). Die Mehrzahl der im Scatterscreen gefundenen neuen Kolonisationsgene war der Kategorie „Zellhülle, Biosynthese & Degradation, Struktur“ zugehörig (17%), zum Beispiel das putative Melittin Resistenz Protein und *Brucella melitensis* PqaB Homolog Lpg0635 und das durch Metallionen aktivierbare Pyridoxal Enzym Lpg2522. Eine weitere grosse Zahl (15%) gefundener Gene entstammt der Kategorie „Proteinschicksal, Modifizierung, Sekretion und Degradation“. Im Vergleich zur siebenprozentigen Repräsentation dieser Gene im Gesamtgenom von *L. pneumophila* Philadelphia-1 ist diese Gruppe unter den Scatterklonen überrepräsentiert. Die *Rickettsia montanensis* CtaQ homologe hitzestabile Carboxypeptidase-1 (Lpg1146) und die putative Apolipoprotein N-Azyltransferase Lpg1349 sind Beispiele aus dieser Rubrik. Interessanterweise sind Gene der Rubrik „zelluläre Prozesse, Detoxifizierung, Adaptation an atypische Bedingungen“ unter den Scatterklonen unterrepräsentiert. Dieser Rubrik entstammen nur 5% der Scatterklone entstammen, aber 12% der Gene werden dem Gesamtgenom zugeordnet. Insgesamt zeigte die Betrachtung und zusammenfassende Gruppierung der Scattergene in funktionelle Gruppen, dass Gene aller Rubriken für die Wirtszellkolonisierung von Wichtigkeit sind und nicht ausschliesslich einer prominenten Rubrik entstammen.

5.2.3 Analyse einer Scattermutante – Charakterisierung des putativen PHB Abbau-Operons *lpg2316/17*

Ausgehend vom Screen sollte eine der identifizierten Mutanten genauer charakterisiert werden. Die Scattermutante D12, die eine Transposoninsertion im Gen *lpg2316* trägt wurde für eine nähere Charakterisierung ausgewählt, da das strangabwärts gelegene Nachbargen *lpg2317* das PLP PatD kodiert und damit gleichzeitig zur Thematik des ersten Teils der Arbeit gehörte. Da experimentell bewiesen wurde, dass die beiden Gene in einem Operon organisiert sind, müssen auch beide in die Interpretation der Ergebnisse einbezogen werden. Das PLP PatD besitzt wie PatA Ähnlichkeit zu ExoU, dem potenten Zytotoxin von *P. aeruginosa*. *lpg2316* kodiert eine 2-Hydroxybutyrat Dehydrogenase, die eine AdoHcyase (Pfam PF05221) Domäne trägt und zu *Sinorhizobium meliloti* BdhA homolog ist. BdhA ist am Abbau von PHB beteiligt (6,37). Für beide Einzelgene oder für das Gesamtoperon wäre eine putative Rolle für die Virulenz des Erregers denkbar. Beide Gene werden zu späten Zeitpunkten der intrazellulären Replikation von *L. pneumophila* in *A. castellanii* 8-fach stärker exprimiert als zu einem früheren Zeitpunkt (14 vs. 10 Stunden nach Infektionsbeginn), was Hinweis auf ihre Einbindung in den virulenten (transmissiven) Phänotyp von *Legionella* ist, der zu späten Stadien exprimiert wird (vgl. 4.1.2) (29). *E. coli patD* Überexpressionsklone besaßen, wie auch für entsprechende *patA* Klone gezeigt, eine erhöhte LPLA Aktivität. Die *L. pneumophila* D12 Mutante zeigte reduzierte PLA und LPLA Aktivität, die durch das Operon *in trans* komplementiert wurde. Ähnlich wie bei PatA, wo enzymatische Tests der lipolytischen Aktivität von *L. pneumophila knockout* Mutanten, *E. coli* Überexpressionsklonen oder reinem Protein in Bezug auf die PLA Aktivität nicht absolut deckungsgleiche Ergebnisse erbrachten, spiegelte sich auch die breite Substratspezifität von PatD, auf die die Tests mit der D12 Mutante hindeuteten, nicht vollständig in den Experimenten vor dem *E. coli* Hintergrund wieder. Offenbar bietet der *L. pneumophila* Hintergrund dem Enzym andere Reaktionsbedingungen, als es bei *E. coli* der Fall ist. Die Ursache kann in einem noch unbekannten Kofaktor, z.B. enzymatischer oder ionischer Natur, liegen, der die enzymatische Aktivität von PatA oder PatD unterstützt bzw. aktiviert, oder auch inhibiert. Experimente zur Aktivierung von rekombinant aufgereinigtem PatA Protein mit *Legionella* Zelllysaten, konnten zwar keine Anhaltspunkte für einen solchen Zusammenhang liefern, aber es gilt zu beachten, dass rekombinant in *E. coli* produziertes Protein z.B. durch posttranslationale Modifikationen nicht identisch mit dem nativen *Legionella* Protein sein muss. Das gilt sowohl für PatA als auch PatD. Es wäre eine sehr sinnvolle Komplettierung der hier durchgeführten Untersuchungen, die enzymatischen Assays mit angereichertem Wildtypprotein aus *L. pneumophila* Zelllysaten durchzuführen, was aber zukünftigen Arbeiten überlassen bleiben muss.

L. pneumophila akkumuliert PHB als Energievorrat für das Überleben in nährstoffarmen Umgebungen, z.B. in wässrigen Umwelthabitaten nach Freisetzung der Bakterien aus Wirtszellen (116,144). Die Akkumulation von PHB in *L. pneumophila* unter Laborkulturbedingungen wurde erstmalig von Helm *et al.* 1991 analytisch über FTIR Spektroskopie gezeigt (100). Die Präsenz von elektronendichten Granula innerhalb von *Legionella* Bakterien, die auf PHB Akkumulation während der intrazellulären Replikation hindeuten, wurde schon von mehreren Forschergruppen berichtet und als wichtige Nährstoffquelle der Bakterien diskutiert (36,116,143,144,179,180). Zum Abbau der PHB Reserven sind mindestens zwei Enzyme notwendig, die das Homopolymer schliesslich in Azetoazetat umbauen (siehe Abb. 4.46). Die putative PHB Dehydrogenase Lpg2316 würde dabei den zweiten Schritt katalysieren, die Oxidation des 3-Hydroxybutyrat-Monomers, welches zuvor von einer PHB Depolymerase generiert wurde. Das erzeugte Azetoazetat kann anschliessend zur Erzeugung von Reduktionsäquivalenten in den Zitratzyklus eingeschleust werden (208).

Der Beitrag von PatD zur Mobilisierung der *L. pneumophila* PHB Reserven könnte in zwei Zusammenhängen bestehen: (a) in der Mobilisierung der PHB Granula für PHB Depolymerasen durch Abbau der Phospholipidschicht welche die Granula umkleidet, oder (b) in der Depolymerisierung des Polymers durch PHB Depolymeraseaktivität.

(a) Bakterielle PHB Granula und eukaryontische Lipideinschlüsse bestehen, zusätzlich zu den Speicherlipiden, aus Proteinen (Phasinen) und einer einfachen Phospholipidschicht die die Granula hydrophilisieren und die Bildung von Aggregaten verhindern (91,155). Phospholipasen A sind in der Lage, die Speicherlipide durch partielle Degradation der Phospholipidschicht den Enzymen des Lipidabbaus zugänglich zu machen (163). May *et al.* demonstrierten, dass eine Patatin-ähnliche PLA der Gurke (*Cucumis sativus*) zur einsetzenden Samenkeimung an Lipid-Granula lokalisiert und an deren Mobilisierung beteiligt ist (145). Eine ähnliche Rolle wäre für PatD denkbar. PatD enthält laut PSORTb Analyse (www.psорт.org) 3 Transmembranhelizes, die die Verankerung des Proteins in der Phospholipidschicht ermöglichen könnten.

(b) Interessanterweise befindet sich im *L. pneumophila* Chromosom kein Homolog bekannter PHB Depolymerasen. Da Legionellen jedoch in der Lage sind, PHB als Energiequelle zu nutzen (116), ergibt sich die Frage wie hier das Polymer monomerisiert wird. PHB Depolymerasen, wie zum Beispiel *Xanthomonas campestris* PhaZ, gehören zur Esterase-Lipase Superfamilie von Enzymen (NCBI CCD: cd00312), die sich durch die katalytische Triade Serin (eingebettet in ein G-X-S-X-G Motiv)-Aspartat (oder Glutamat)-Histidin auszeichnen und eine Alpha/Beta Faltung aufweisen. Aufgrund der Verwandtschaft von Alpha/Beta Hydrolasen und der für Lipasen typischen katalytischen Triade mit Patatin und PLP sowie der chromosomalen Organisation (Operon) von *lpg2316(bdhA)* und *patD* lässt sich

Diskussion

spekulieren, dass das *patD* Genprodukt an der Mobilisierung von PHB in *L. pneumophila* beteiligt sein könnte. Die Experimente haben gezeigt, dass *L. pneumophila* D12 Mutanten mehr PHB enthielten als Wildtypbakterien. Dies zeigt, dass die Ausschaltung des *lpg2316/17* Operons durch die Transposoninsertion tatsächlich einen Einfluss auf den *L. pneumophila* PHB Stoffwechsel besitzt. Da es sich bei Lpg2316 (BdhA) um ein Protein des PHB Abbaus handelt, und auch PatD als Phospholipase oder als PHB Depolymerase an der Mobilisierung von PHB beteiligt sein könnte, erscheint es wahrscheinlich, dass der Verlust von *lpg2316/17* zur Verringerung der PHB Mobilisierung in Mutante D12 führt. Folglich ist es wenig verwunderlich, dass Mutante D12 zu allen untersuchten Zeitpunkten über grössere PHB Reserven verfügte. Die Hypothese, dass Lpg2316 gemeinsam und kooperativ mit PatD an der PHB Mobilisierung von *L. pneumophila* beteiligt ist, wird durch die Ergebnisse der Komplementationsexperimente unterstützt. *L. pneumophila* D12 Mutanten, die *lpg2316/17 in trans* trugen (auf dem Vektor pBCKS, einem „*high copy*“ Vektor), „überkomplementierten“ den erhöhten PHB Gehalt von Mutante D12 und enthielten gemäss der in dieser Arbeit durchgeführten FTIR Messungen nach mehrtägiger Inkubation auf Agarplatten annähernd keine intrazellulären PHB Reserven mehr.

Weiterhin wurde der virulenzattenuierte Phänotyp der Mutante D12 im Amöbeninfektionsmodell durch *trans*-Komplementation mit dem Operon *lpg2316/17* auf Wildtypniveau wiederhergestellt was die Wichtigkeit des Operons für die Virulenz des Bakteriums bestätigt. Interessanterweise wurde keine Komplementation des virulenzattenuierten Phänotyps durch Einbringen der beiden Einzelgene erreicht (nicht gezeigt). Lipidhydrolysetests mit Zelllysaten von *E. coli*, die *patD in trans* oder *lpg2316+patD in trans* exprimierten, bestätigten, dass die lipolytische Aktivität des Operons *patD* abhängig ist, da beide Zelllysate über die gleiche lipolytische Aktivität verfügten (nicht gezeigt). Die Daten weisen darauf hin, dass die Gene des Lokus *lpg2316/17* kooperativ an der Mobilisation von PHB durch *L. pneumophila* beteiligt sind und dies eine essentielle Eigenschaft für die intrazelluläre Replikation des Bakteriums in Amöben darstellt.

In zukünftigen Untersuchungen wäre es von Bedeutung die Rolle beider im Operon organisierten Einzelgene für die beobachteten Phänotypen zu evaluieren. Insbesondere wäre es eine notwendige Ergänzung, eine *lpg2317 (patD)* Mutante zu generieren, bei der die Expression von *lpg2316* uneingeschränkt stattfindet. Dies würde erlauben die mögliche Rolle von PatD im PHB Stoffwechsel zu evaluieren. Zusätzlich müsste der PHB-reiche Phänotyp der Mutante D12 besser diskriminiert werden, indem in Experimenten unter PHB-mobilisierenden Bedingungen bestätigt wird, dass sich der Verlust von *lpg2316/17* auf den Abbau von PHB Reserven auswirkt, die Synthese hingegen aber unverändert stattfindet.

5.2.4 Beispiele weiterer neuer putativer *L. pneumophila* Kolonisationsgene

Wie bereits ersichtlich wurde, bieten die Ergebnisse des Scatterscreens eine vielfältige Auswahl an Folgeprojekten. Gene von besonderem Interesse könnten dabei die Gene *lpg1665*, welches ein α_2 -Makroglubulin-ähnliches Protein kodiert (es trägt eine A2M_N_2 α_2 -Makroglobulin-Domäne), *lpg0230* (es kodiert einen putativen *response regulator* mit GGDEF-Domäne) oder *lpg2494* (kodiert eine putative Kynurenin Formamidase) sein.

α_2 -Makroglubuline sind einer der Hauptbestandteile von humanem Blutserum und experimentell bisher nur in Eukaryonten untersucht. Als potente Proteaseinhibitoren sind sie ein wichtiges Verteidigungselement vielzelliger Organismen, die Proteasen invasiver Bakterien blocken. Budd et al. fanden in 2004 durch Datenbankrecherchen, dass viele Bakterien die höhere Eukaryonten ausbeuten α_2 -Makroglubulin-ähnliche Proteine kodieren (z.B. *Helicobacter hepaticus*, *Salmonella typhimurium* u.v.m.) (31). Da diese vormals nur von Eukaryonten bekannten Proteine in der Lage sein könnten wirtszellspezifische, proteolytische Verteidigungsstrategien zu inhibieren, postulierten Budd et al. eine wichtige Rolle dieser Proteine als bakterieller Wirtszell-Kolonisationsfaktor. Die Identifikation eines *Legionella*-kodierten α_2 -Makroglubulin-ähnlichen Proteins im Scatterscreen erbringt erstmalig experimentell erworbene Hinweise für die Richtigkeit der Hypothese von Budd et al (31).

Lpg0230 besitzt partielle Proteinhomologie zu *Ehrlichia chaffeensis* PleD (37% identities, expect value 3e-31) und trägt eine GGDEF Domäne, die häufig mit regulatorischen Proteinen assoziiert auftritt. GGDEF Domänen besitzen Diguanylat-Zyklase Aktivität und können zyklisches di-GMP (c-di-GMP) synthetisieren, welches einen wichtigen bakteriellen *second messenger* darstellt, der an der Regulation von Prozessen wie Exopolysaccharidsynthese, Motilität, Biofilmbildung, Zelldifferenzierung und Virulenz beteiligt ist (49,167,190). PleD wurde in *E. chaffeensis*, einem obligat intrazellulären Pathogen, als *response regulator* und Teil des virulenzassoziierten Zweikomponentensystems (TCS) PleC/PleD charakterisiert. PleD wird unter *in vitro* Bedingungen spezifisch von der Sensor Histidin Kinase PleC phosphoryliert und spielt eine Rolle bei der durch *Ehrlichia* induzierten Inhibition der phagolysosomalen Verschmelzung (123). *L. pneumophila* kodiert mehrere zum Teil uncharakterisierte Sensor Histidin Kinasen, die partielle Proteinhomologie zur *E. chaffeensis* PleC besitzen. Das nächste Homolog ist *L. pneumophila* LetS (e-value 1e-41), der Sensor des *L. pneumophila* TCS LetA/LetS, welches vielfältig in die Expression des transmissiven Phänotyps von *L. pneumophila* eingebunden ist. Es ist essentiell für die Replikation von *L. pneumophila* in Amöben (77,96,139). Aufgrund der Identifikation von *lpg0230* im Scatterscreen stellt sich die Frage, ob *L. pneumophila* Philadelphia-1 über ein weiteres virulenzassoziiertes TCS verfügt, welches eine ähnliche Rolle wie *E. chaffeensis* PleC/D

Diskussion

spielt bzw. ob Lpg0230 in der Lage ist, LetS-abhängig phosphoryliert zu werden. So könnte es zum Beispiel durch c-di-GMP Synthese an der Vermittlung LetS abhängiger oder -unabhängiger Phänotypen (Zytotoxizität, Inhibition phagolysosomaler Verschmelzung, Motilität) (96) beteiligt sein. Eine phänotypische Untersuchung der *lpg0230* Mutante sollte Aufschluss über die Regulation von Virulenzgenen in *L. pneumophila* und die Rolle von GGDEF-Domänen Proteinen für die Pathogenese des Bakteriums geben. Dies wäre ein weiteres interessantes Folgeprojekt der vorliegenden Arbeit.

L. pneumophila Philadelphia-1 *lpg2494* kodiert eine putative Kynurenin Formamidase. Diese Enzyme sind an der Verstoffwechselung von L-Tryptophan zu Anthranilat beteiligt (63,126). Interessanterweise ist Anthranilat die chemische Vorstufe des *P. aeruginosa* PQS (*Pseudomonas quinolone signal*) welches als Induktor des Transkriptionsfaktors PqsR wirkt und somit an der Regulation (Induktion) zahlreicher *P. aeruginosa* Virulenzgene beteiligt ist (126). PqsR ist im *L. pneumophila* Genom konserviert und dort als Transkriptionsfaktor der LysR Familie (*LysR-type transcriptional regulators*, LTTRs) annotiert (*lpg0280*, e-value 1e-08). HexA, ein *Erwinia carotovora* LTTR ist an der Regulation von Motilität und zahlreichen Virulenzdeterminanten des Bakteriums beteiligt. Da *lpg2494* im Scatterscreen identifiziert wurde, kann spekuliert werden, dass das Gen an der Induktion der Expression von *Legionella* Virulenzdeterminanten beteiligt ist. Bisher sind Erkenntnisse über die Regulation der *L. pneumophila* Virulenzgene rar. Die Identifikation von *lpg2494* im Scatterscreen eröffnet daher eine weitere Möglichkeit, in einem Folgeprojekt wichtige Erkenntnisse über die Virulenz des Erregers zu erarbeiten.

Der im Rahmen dieser Arbeit entwickelte Scatterscreen wurde erfolgreich zur Identifizierung bekannter und putativer neuer *L. pneumophila* Wirtszellkolonisationsgene angewendet. Die Einfachheit des Testsystems erlaubt die Untersuchung einer beliebig grossen Anzahl von *L. pneumophila* Insertionsmutanten. Die Tatsache, dass 32% der isolierten Klone Mutationen in bekannten *Legionella* Wirtszellkolonisations- oder Virulenzgenen trugen bestätigt die Funktionalität des Testsystems.

Im hier durchgeführten Screen von 26.000 Insertionsmutanten wurden 82 Mutanten in bisher uncharakterisierten putativen Wirtszellkolonisationsgenen isoliert. Die Charakterisierung der einzelnen Gene und die Aufklärung ihrer Funktion bei der Kolonisation von *A. castellanii* kann wichtige Erkenntnisse über die Virulenzmechanismen von *L. pneumophila* liefern. Anfänge dazu sind hier geschaffen, eine ganze Reihe von Ideen für zukünftige Arbeiten an dieser Fragestellung ergeben sich daraus fast zwangsläufig. Ihre praktische Umsetzung in naher Zukunft erscheint wichtig und höchst wünschenswert.

6. Referenzen

1. Abu, K. Y. 1996. The phagosome containing *Legionella pneumophila* within the protozoan *Hartmannella vermiformis* is surrounded by the rough endoplasmic reticulum
2. Appl. Environ. Microbiol. 62:2022-2028.
2. Al-Khodor, S., S. Kalachikov, I. Morozova, C. T. Price, and Y. bu Kwaik. 2008. The PmrA/B two component system of *Legionella pneumophila* is a global regulator required for Intracellular Replication within macrophages and protozoa. Infect. Immun. IAI.
3. Allewelt, M., F. T. Coleman, M. Grout, G. P. Priebe, and G. B. Pier. 2000. Acquisition of expression of the *Pseudomonas aeruginosa* ExoU cytotoxin leads to increased bacterial virulence in a murine model of acute pneumonia and systemic spread
1. Infect. Immun. 68:3998-4004.
4. Anderson, A. J. and E. A. Dawes. 1990. Occurrence, metabolism, metabolic role, and industrial uses of bacterial polyhydroxyalkanoates. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 54:450-472.
5. Andrews, D. L., B. Beames, M. D. Summers, and W. D. Park. 1988. Characterization of the lipid acyl hydrolase activity of the major potato (*Solanum tuberosum*) tuber protein, patatin, by cloning and abundant expression in a baculovirus vector
1. Biochem. J. 252:199-206.
6. Aneja, P. and T. C. Charles. 2005. Characterization of *bdhA*, encoding the enzyme D-3-hydroxybutyrate dehydrogenase, from *Sinorhizobium* sp. strain NGR234. FEMS Microbiology Letters 242:87-94.
7. Aragon, V., S. Kurtz, and N. P. Cianciotto. 2001. *Legionella pneumophila* major acid phosphatase and its role in intracellular infection
3. Infect. Immun. 69:177-185.
8. Aragon, V., S. Kurtz, A. Flieger, B. Neumeister, and N. P. Cianciotto. 2000. Secreted enzymatic activities of wild-type and *pilD*-deficient *Legionella pneumophila*
4. Infect. Immun. 68:1855-1863.
9. Aragon, V., O. Rossier, and N. P. Cianciotto. 2002. *Legionella pneumophila* genes that encode lipase and phospholipase C activities
2. Microbiology 148:2223-2231.
10. Aravind, L. and E. V. Koonin. 2000. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination
15. Curr. Biol. 10:R132-R134.
11. Armstrong, P. B. 2006. Proteases and protease inhibitors: a balance of activities in host-pathogen interaction
2. Immunobiology 211:263-281.

Referenzen

12. **Bachman, M. A. and M. S. Swanson. 2001. RpoS co-operates with other factors to induce Legionella pneumophila virulence in the stationary phase. Mol. Microbiol. 40:1201-1214.**
13. **Baine, W. B., J. K. Rasheed, H. W. Maca, and A. F. Kaufmann. 1979. Hemolytic activity of plasma and urine from rabbits experimentally infected with Legionella pneumophila
1. Rev. Infect. Dis. 1:912-917.**
14. **Balderas-Renteria, I., J. F. García-L zaro, P. Carranza-Rosales, L. H. Morales-Ramos, L. J. Galan-Wong, and L. E. Muñoz-Espinosa. 2007. Transcriptional Upregulation of Genes Related to Virulence Activation in Entamoeba histolytica. Archives of Medical Research 38:372-379.**
15. **Banerji, S., P. Aurass, and A. Flieger. 2008. The manifold phospholipases A of Legionella pneumophila - identification, export, regulation, and their link to bacterial virulence. Int. J. Med. Microbiol. 298:169-181.**
16. **Banerji, S., M. Bewersdorff, B. Hermes, N. P. Cianciotto, and A. Flieger. 2005. Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of Legionella pneumophila. Infect. Immun. 73:2899-2909.**
17. **Banerji, S. and A. Flieger. 2004. Patatin-like proteins: a new family of lipolytic enzymes present in bacteria? Microbiology 150:522-525.**
18. **Albert-Weissenberger, C., C. Cazalet, and C. Buchrieser. 2007. Legionella pneumophila - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa. Cell Mol. Life Sci. 64:432-448.**
19. **Albert-Weissenberger, C., C. Cazalet, and C. Buchrieser. 2007. Legionella pneumophila - a human pathogen that co-evolved with fresh water protozoa
3. Cell Mol. Life Sci. 64:432-448.**
20. **Berthelot, P., I. Attree, P. Plesiat, J. Chabert, B. S. de, B. Pozzetto, and F. Grattard. 2003. Genotypic and phenotypic analysis of type III secretion system in a cohort of Pseudomonas aeruginosa bacteremia isolates: evidence for a possible association between O serotypes and exo genes
1. J. Infect. Dis. 188:512-518.**
21. **Bitar, D. M., M. Molmeret, and Y. A. Kwaik. 2005. Structure-function analysis of the C-terminus of IcmT of Legionella pneumophila in pore formation-mediated egress from macrophages
1. FEMS Microbiol. Lett. 242:177-184.**
22. **BLIGH, E. G. and W. J. DYER. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification
1. Can. J. Biochem. Physiol 37:911-917.**
23. **Borella, P., E. Guerrieri, I. Marchesi, M. Bondi, and P. Messi. 2005. Water ecology of Legionella and protozoan: environmental and public health perspectives, p. 355-380. In M. R. El-Gewely (ed.), Biotechnology Annual Review. Elsevier.**

24. Bozue, J. A. and W. Johnson. 1996. Interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*: uptake by coiling phagocytosis and inhibition of phagosome-lysosome fusion
1. Infect. Immun. 64:668-673.
25. Brieland, J., M. McClain, L. Heath, C. Chrisp, G. Huffnagle, M. LeGendre, M. Hurley, J. Fantone, and C. Engleberg. 1996. Coinoculation with *Hartmannella vermiformis* enhances replicative *Legionella pneumophila* lung infection in a murine model of Legionnaires' disease
2. Infect. Immun. 64:2449-2456.
26. Brieland, J., M. McClain, M. LeGendre, and C. Engleberg. 1997. Intrapulmonary *Hartmannella vermiformis*: a potential niche for *Legionella pneumophila* replication in a murine model of legionellosis
2. Infect. Immun. 65:4892-4896.
27. Brieland, J. K., J. C. Fantone, D. G. Remick, M. LeGendre, M. McClain, and N. C. Engleberg. 1997. The role of *Legionella pneumophila*-infected *Hartmannella vermiformis* as an infectious particle in a murine model of Legionnaire's disease
1. Infect. Immun. 65:5330-5333.
28. Broich, M., K. Rydzewski, T. L. McNealy, R. Marre, and A. Flieger. 2006. The global regulatory proteins LetA and RpoS control phospholipase A, lysophospholipase A, acyltransferase, and other hydrolytic activities of *Legionella pneumophila* JR32
1. J. Bacteriol. 188:1218-1226.
29. Bruggemann, H., A. Hagman, M. Jules, O. Sismeiro, M. A. Dillies, C. Gouyette, F. Kunst, M. Steinert, K. Heuner, J. Y. Coppee, and C. Buchrieser. 2006. Virulence strategies for infecting phagocytes deduced from the in vivo transcriptional program of *Legionella pneumophila*
2. Cell Microbiol. 8:1228-1240.
30. Abu-Zant, A., S. Jones, R. Asare, J. Suttles, C. Price, J. Graham, and Y. A. Kwaik. 2007. Anti-apoptotic signalling by the Dot/Icm secretion system of *L. pneumophila*
1. Cell Microbiol. 9:246-264.
31. Budd, A., S. Blandin, E. A. Levashina, and T. J. Gibson. 2004. Bacterial alpha2-macroglobulins: colonization factors acquired by horizontal gene transfer from the metazoan genome? Genome Biol. 5:R38.
32. Byrne, B. and M. S. Swanson. 1998. Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. Infect. Immun. 66:3029-3034.
33. Cain, R. J., R. D. Hayward, and V. Koronakis. 2004. The target cell plasma membrane is a critical interface for *Salmonella* cell entry effector-host interplay
1. Mol. Microbiol. 54:887-904.
34. Cassaing, S., J. Fauvel, M. H. Bessieres, S. Guy, J. P. Seguela, and H. Chap. 2000. *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A(2)
1. Int. J. Parasitol. 30:1137-1142.

35. Cazalet, C., C. Rusniok, H. Bruggemann, N. Zidane, A. Magnier, L. Ma, M. Tichit, S. Jarraud, C. Bouchier, F. Vandenesch, F. Kunst, J. Etienne, P. Glaser, and C. Buchrieser. 2004. Evidence in the *Legionella pneumophila* genome for exploitation of host cell functions and high genome plasticity. *Nat. Genet.* 36:1165-1173.
36. Chandler, F. W., R. M. Cole, M. D. Hicklin, J. A. Blackmon, and C. S. Callaway. 1979. Ultrastructure of the Legionnaires' disease bacterium. A study using transmission electron microscopy
1. *Ann. Intern. Med.* 90:642-647.
37. Charles, T. C., C. Cai, and P. Aneja. 1997. Megaplasmid and Chromosomal Loci for the PHB Degradation Pathway in *Rhizobium* (*Sinorhizobium*) *meliloti*. *Genetics* 146:1211-1220.
38. Chen, J., K. S. de Felipe, M. Clarke, H. Lu, O. R. Anderson, G. Segal, and H. A. Shuman. 2004. *Legionella* Effectors That Promote Nonlytic Release from Protozoa. *Science* 303:1358-1361.
39. Chien, M., I. Morozova, S. Shi, H. Sheng, J. Chen, S. M. Gomez, G. Asamani, K. Hill, J. Nuara, M. Feder, J. Rineer, J. J. Greenberg, V. Steshenko, S. H. Park, B. Zhao, E. Teplitskaya, J. R. Edwards, S. Pampou, A. Georghiou, I. C. Chou, W. Iannuccilli, M. E. Ulz, D. H. Kim, A. Geringer-Sameth, C. Goldsberry, P. Morozov, S. G. Fischer, G. Segal, X. Qu, A. Rzhetsky, P. Zhang, E. Cayanis, P. J. De Jong, J. Ju, S. Kalachikov, H. A. Shuman, and J. J. Russo. 2004. The genomic sequence of the accidental pathogen *Legionella pneumophila*
2. *Science* 305:1966-1968.
40. Chomczynski, P. and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159.
41. Choukroun, G. J., V. Marshansky, C. E. Gustafson, M. McKee, R. J. Hajjar, A. Rosenzweig, D. Brown, and J. V. Bonventre. 2000. Cytosolic phospholipase A(2) regulates golgi structure and modulates intracellular trafficking of membrane proteins. *J. Clin. Invest* 106:983-993.
42. Cianciotto, N. P. 2005. Type II secretion: a protein secretion system for all seasons
2. *Trends Microbiol.* 13:581-588.
43. Cirillo, J. D., S. L. Cirillo, L. Yan, L. E. Bermudez, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1999. Intracellular growth in *Acanthamoeba castellanii* affects monocyte entry mechanisms and enhances virulence of *Legionella pneumophila*
1. *Infect. Immun.* 67:4427-4434.
44. Cirillo, J. D., S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1994. Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infect. Immun.* 62:3254-3261.
45. Cirillo, S. L. G., L. E. Bermudez, S. H. El-Etr, G. E. Duhamel, and J. D. Cirillo. 2001. *Legionella pneumophila* Entry Gene *rtxA* Is Involved in Virulence. *Infect. Immun.* 69:508-517.

46. Cirillo, S. L. G., J. Lum, and J. D. Cirillo. 2000. Identification of novel loci involved in entry by *Legionella pneumophila*. *Microbiology* 146:1345-1359.
47. Cirillo, S. L. G., L. Yan, M. Littman, M. M. Samrakandi, and J. D. Cirillo. 2002. Role of the *Legionella pneumophila* rtxA gene in amoebae. *Microbiology* 148:1667-1677.
48. Conover, G. M., I. Derre, J. P. Vogel, and R. R. Isberg. 2003. The *Legionella pneumophila* LidA protein: a translocated substrate of the Dot/Icm system associated with maintenance of bacterial integrity. *Mol. Microbiol.* 48:305-321.
49. Cotter, P. A. and S. Stibitz. 2007. c-di-GMP-mediated regulation of virulence and biofilm formation
1. *Curr. Opin. Microbiol.* 10:17-23.
50. Cuzick, A., F. R. Stirling, S. L. Lindsay, and T. J. Evans. 2006. The type III pseudomonal exotoxin U activates the c-Jun NH2-terminal kinase pathway and increases human epithelial interleukin-8 production
2. *Infect. Immun.* 74:4104-4113.
51. Dawes, E. A. and P. J. Senior. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in micro-organisms
16. *Adv. Microb. Physiol* 10:135-266.
52. De Buck, E., I. Lebeau, L. Maes, N. Geukens, E. Meyen, L. Van Mellaert, J. Annø, and E. Lammertyn. 2004. A putative twin-arginine translocation pathway in *Legionella pneumophila*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 317:654-661.
53. de, F. P., D. Drecktrah, J. A. Katzenellenbogen, M. Strang, and W. J. Brown. 1998. Evidence that phospholipase A2 activity is required for Golgi complex and trans Golgi network membrane tubulation
37. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:8642-8647.
54. Debroy, S., V. Aragon, S. Kurtz, and N. P. Cianciotto. 2006. *Legionella pneumophila* Mip, a surface-exposed peptidylproline cis-trans-isomerase, promotes the presence of phospholipase C-like activity in culture supernatants. *Infect. Immun.* 74:5152-5160.
55. Dennis, E. A. 1997. The growing phospholipase A2 superfamily of signal transduction enzymes
1. *Trends Biochem. Sci.* 22:1-2.
56. DeRosier, D. J. 1998. The turn of the screw: the bacterial flagellar motor
1. *Cell* 93:17-20.
57. Derre, I. and R. R. Isberg. 2005. LidA, a translocated substrate of the *Legionella pneumophila* type IV secretion system, interferes with the early secretory pathway
2. *Infect. Immun.* 73:4370-4380.

58. Dhondt, S., P. Geoffroy, B. A. Stelmach, M. Legrand, and T. Heitz. 2000. Soluble phospholipase A2 activity is induced before oxylipin accumulation in tobacco mosaic virus-infected tobacco leaves and is contributed by patatin-like enzymes 5. *Plant J.* 23:431-440.
59. Dietrich, C., K. Heuner, B. C. Brand, J. Hacker, and M. Steinert. 2001. Flagellum of *Legionella pneumophila* Positively Affects the Early Phase of Infection of Eukaryotic Host Cells. *Infect. Immun.* 69:2116-2122.
60. Edelstein, P. H. 1981. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* 14:298-303.
61. Edelstein, P. H., M. A. Edelstein, F. Higa, and S. Falkow. 1999. Discovery of virulence genes of *Legionella pneumophila* by using signature tagged mutagenesis in a guinea pig pneumonia model 4. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 96:8190-8195.
62. Eswarappa, S. M., K. K. Panguluri, M. Hensel, and D. Chakravorty. 2008. The *yejABEF* operon of *Salmonella* confers resistance to antimicrobial peptides and contributes to its virulence 1. *Microbiology* 154:666-678.
63. Farrow, J. M., III and E. C. Pesci. 2007. Two distinct pathways supply anthranilate as a precursor of the *Pseudomonas* quinolone signal 2. *J. Bacteriol.* 189:3425-3433.
64. Faulkner, G. and R. A. Garduno. 2002. Ultrastructural analysis of differentiation in *Legionella pneumophila* 3. *J. Bacteriol.* 184:7025-7041.
65. Feeley, J. C., R. J. Gibson, G. W. Gorman, N. C. Langford, J. K. Rasheed, D. C. Mackel, and W. B. Baine. 1979. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* 10:437-441.
66. Fettes, P. S., M. Susa, J. Hacker, and R. Marre. 2000. Characterization of the *Legionella pneumophila* gene *ligA*. *Int. J. Med. Microbiol.* 290:239-250.
67. Fields, B. S. 1996. The molecular ecology of legionellae 1. *Trends Microbiol.* 4:286-290.
68. Finck-Barbancon, V., J. Goranson, L. Zhu, T. Sawa, J. P. Wiener-Kronish, S. M. Fleiszig, C. Wu, L. Mende-Mueller, and D. W. Frank. 1997. ExoU expression by *Pseudomonas aeruginosa* correlates with acute cytotoxicity and epithelial injury 1. *Mol. Microbiol.* 25:547-557.
69. Finck-Barbancon, V. and D. W. Frank. 2001. Multiple Domains Are Required for the Toxic Activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. *J. Bacteriol.* 183:4330-4344.
70. Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, M. Deeg, P. Bartmann, and B. Neumeister. 2000. Novel phospholipase A activity secreted by *Legionella* species. *J. Bacteriol.* 182:1321-1327.

71. Flieger, A., S. Gong, M. Faigle, S. Stevanovic, N. P. Cianciotto, and B. Neumeister. 2001. Novel lysophospholipase A secreted by *Legionella pneumophila*
8. J. Bacteriol. 183:2121-2124.
72. Flieger, A., B. Neumeister, and N. P. Cianciotto. 2002. Characterization of the gene encoding the major secreted lysophospholipase A of *Legionella pneumophila* and its role in detoxification of lysophosphatidylcholine. Infect. Immun. 70:6094-6106.
73. Flieger, A., K. Rydzewski, S. Banerji, M. Broich, and K. Heuner. 2004. Cloning and characterization of the gene encoding the major cell-associated phospholipase A of *Legionella pneumophila*, *plaB*, exhibiting hemolytic activity. Infect. Immun. 72:2648-2658.
74. Forsberg, A. and T. Guina. 2007. Type II secretion and type IV pili of *Francisella*. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1105:187-201.
75. Frisch, C. F. and W. B. Baine. 1984. Production of extracellular hemolytic cytotoxin by *Legionella bozemanii*
30. Microbiol. Immunol. 28:1267-1272.
76. Fuchs, T. M., H. Deppisch, V. Scarlato, and R. Gross. 1996. A new gene locus of *Bordetella pertussis* defines a novel family of prokaryotic transcriptional accessory proteins. J. Bacteriol. 178:4445-4452.
77. Gal-Mor, O. and G. Segal. 2003. The *Legionella pneumophila* GacA homolog (LetA) is involved in the regulation of *icm* virulence genes and is required for intracellular multiplication in *Acanthamoeba castellanii*
3. Microb. Pathog. 34:187-194.
78. Gal-Mor, O., T. Zusman, and G. Segal. 2002. Analysis of DNA regulatory elements required for expression of the *Legionella pneumophila* *icm* and *dot* virulence genes
1. J. Bacteriol. 184:3823-3833.
79. Galliard, T. 1971. The enzymic deacylation of phospholipids and galactolipids in plants. Purification and properties of a lipolytic acyl-hydrolase from potato tubers
4. Biochem. J. 121:379-390.
80. Galperin, M. Y., A. N. Nikolskaya, and E. V. Koonin. 2001. Novel domains of the prokaryotic two-component signal transduction systems. FEMS Microbiology Letters 203:11-21.
81. Gao, L. Y., O. S. Harb, and Y. bu Kwaik. 1997. Utilization of similar mechanisms by *Legionella pneumophila* to parasitize two evolutionarily distant host cells, mammalian macrophages and protozoa. Infect. Immun. 65:4738-4746.
82. Gao, L. Y., O. S. Harb, and Y. A. Kwaik. 1998. Identification of Macrophage-Specific Infectivity Loci (*mil*) of *Legionella pneumophila* That Are Not Required for Infectivity of Protozoa. Infect. Immun. 66:883-892.

83. Gentzsch, M. and W. Tanner. 1996. The PMT gene family: protein O-glycosylation in *Saccharomyces cerevisiae* is vital
1. EMBO J. 15:5752-5759.
84. Gerlach, R. G. and M. Hensel. 2007. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens
6. Int. J. Med. Microbiol. 297:401-415.
85. Gibson, F. C., III, A. O. Tzianabos, and F. G. Rodgers. 1994. Adherence of *Legionella pneumophila* to U-937 cells, guinea-pig alveolar macrophages, and MRC-5 cells by a novel, complement-independent binding mechanism
1. Can. J. Microbiol. 40:865-872.
86. Girod, A., C. E. Wobus, Z. Zadori, M. Ried, K. Leike, P. Tijssen, J. A. Kleinschmidt, and M. Hallek. 2002. The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A2 domain required for virus infectivity
1. J. Gen. Virol. 83:973-978.
87. Glöckner, G., C. Albert-Weissenberger, E. Weinmann, S. Jacobi, E. Schunder, M. Steinert, J. r. Hacker, and K. Heuner. Identification and characterization of a new conjugation/type IVA secretion system (trb/tra) of *Legionella pneumophila* Corby localized on two mobile genomic islands. International Journal of Medical Microbiology In Press, Corrected Proof.
88. Gottfredsson, M., C. J. Jessup, G. M. Cox, J. R. Perfect, and M. A. Ghannoum. 2001. Fungal phospholipase activity and susceptibility to lipid preparations of amphotericin B
1. Antimicrob. Agents Chemother. 45:3231-3233.
89. Graham, J. E. and J. E. Clark-Curtiss. 1999. Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS)
3. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 96:11554-11559.
90. Greenspan, P., E. P. Mayer, and S. D. Fowler. 1985. Nile red: a selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets
3. J. Cell Biol. 100:965-973.
91. Griebel, R., Z. Smith, and J. M. Merrick. 1968. Metabolism of poly-beta-hydroxybutyrate. I. Purification, composition, and properties of native poly-beta-hydroxybutyrate granules from *Bacillus megaterium*. Biochemistry 7:3676-3681.
92. Hakansson, S., E. E. Galyov, R. Rosqvist, and H. Wolf-Watz. 1996. The *Yersinia* YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane
1. Mol. Microbiol. 20:593-603.
93. Hales, L. M. and H. A. Shuman. 1999. The *Legionella pneumophila* rpoS gene is required for growth within *Acanthamoeba castellanii*. J. Bacteriol. 181:4879-4889.
94. Hamm, H., H. Fabel, and W. Bartsch. 1992. The surfactant system of the adult lung: physiology and clinical perspectives
2. Clin. Investig. 70:637-657.

95. Hammer, B. K. and M. S. Swanson. 1999. Co-ordination of legionella pneumophila virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Mol. Microbiol.* 33:721-731.
96. Hammer, B. K., E. S. Tateda, and M. S. Swanson. 2002. A two-component regulator induces the transmission phenotype of stationary-phase *Legionella pneumophila*. *Molecular Microbiology* 44:107-118.
97. Hanna, M. N., R. J. Ferguson, Y. H. Li, and D. G. Cvitkovitch. 2001. *uvrA* Is an Acid-Inducible Gene Involved in the Adaptive Response to Low pH in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 183:5964-5973.
98. Hauser, A. R., E. Cobb, M. Bodi, D. Mariscal, J. Valles, J. N. Engel, and J. Rello. 2002. Type III protein secretion is associated with poor clinical outcomes in patients with ventilator-associated pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Crit Care Med.* 30:521-528.
99. Hauser, A. R., P. J. Kang, and J. N. Engel. 1998. *PepA*, a secreted protein of *Pseudomonas aeruginosa*, is necessary for cytotoxicity and virulence. *Mol. Microbiol.* 27:807-818.
100. Helm, D., H. Labischinski, G. Schallehn, and D. Naumann. 1991. Classification and identification of bacteria by Fourier-transform infrared spectroscopy. *J. Gen. Microbiol.* 137:69-79.
101. Heuner, K. and M. Steinert. 2003. The flagellum of *Legionella pneumophila* and its link to the expression of the virulent phenotype. *International Journal of Medical Microbiology* 293:133-143.
102. Heusipp, G., S. Falker, and M. A. Schmidt. 2007. DNA adenine methylation and bacterial pathogenesis. *Int. J. Med. Microbiol.* 297:1-7.
103. Higa, F. and P. H. Edelstein. 2001. Potential virulence role of the *Legionella pneumophila* *ptsP* ortholog. *Infect. Immun.* 69:4782-4789.
104. Hirschberg, H. J., J. W. Simons, N. Dekker, and M. R. Egmond. 2001. Cloning, expression, purification and characterization of patatin, a novel phospholipase A. *Eur. J. Biochem.* 268:5037-5044.
105. Holk, A., S. Rietz, M. Zahn, H. Quader, and G. F. Scherer. 2002. Molecular identification of cytosolic, patatin-related phospholipases A from *Arabidopsis* with potential functions in plant signal transduction. *Plant Physiol* 130:90-101.
106. Holm, B. A., L. Keicher, M. Y. Liu, J. Sokolowski, and G. Enhorning. 1991. Inhibition of pulmonary surfactant function by phospholipases. *J. Appl. Physiol* 71:317-321.
107. Horwitz, M. A. 1983. Formation of a novel phagosome by the Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158:1319-1331.

Referenzen

108. Horwitz, M. A. 1983. The Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) inhibits phagosome-lysosome fusion in human monocytes. *J. Exp. Med.* 158:2108-2126.
109. Horwitz, M. A. 1987. Characterization of avirulent mutant *Legionella pneumophila* that survive but do not multiply within human monocytes. *J. Exp. Med.* 166:1310-1328.
110. Horwitz, M. A. and F. R. Maxfield. 1984. *Legionella pneumophila* inhibits acidification of its phagosome in human monocytes
1. *J. Cell Biol.* 99:1936-1943.
111. Horwitz, M. A. and S. C. Silverstein. 1980. Legionnaires' disease bacterium (*Legionella pneumophila*) multiples intracellularly in human monocytes. *J. Clin. Invest* 66:441-450.
112. Hurley, J. H. and S. Misra. 2000. SIGNALING AND SUBCELLULAR TARGETING BY MEMBRANE-BINDING DOMAINS1. *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* 29:49-79.
113. Irvine, R. F. 1982. How is the level of free arachidonic acid controlled in mammalian cells?
23. *Biochem. J.* 204:3-16.
114. Istivan, T. S. and P. J. Coloe. 2006. Phospholipase A in Gram-negative bacteria and its role in pathogenesis
3. *Microbiology* 152:1263-1274.
115. Jacobi, S. and K. Heuner. 2003. Description of a putative type I secretion system in *Legionella pneumophila*
1. *Int. J. Med. Microbiol.* 293:349-358.
116. James, B. W., W. S. Mauchline, P. J. Dennis, C. W. Keevil, and R. Wait. 1999. Poly-3-Hydroxybutyrate in *Legionella pneumophila*, an Energy Source for Survival in Low-Nutrient Environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:822-827.
117. Jenal, U. and J. Malone. 2006. Mechanisms of cyclic-di-GMP signaling in bacteria. *Annu. Rev. Genet.* 40:385-407.
118. Jendrossek, D. and R. Handrick. 2002. Microbial degradation of polyhydroxyalkanoates
16. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:403-432.
119. Kenny, B., R. DeVinney, M. Stein, D. J. Reinscheid, E. A. Frey, and B. B. Finlay. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Cell* 91:511-520.
120. Kirby, J. E., J. P. Vogel, H. L. Andrews, and R. R. Isberg. 1998. Evidence for pore-forming ability by *Legionella pneumophila*
3. *Mol. Microbiol.* 27:323-336.

121. Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H. D. Ulrich, T. U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly
1. Cell 96:635-644.
122. Kubori, T., A. Hyakutake, and H. Nagai. 2008. Legionella translocates an E3 ubiquitin ligase that has multiple U-boxes with distinct functions. Mol. Microbiol. 67:1307-1319.
123. Kumagai, Y., Z. Cheng, M. Lin, and Y. Rikihisa. 2006. Biochemical Activities of Three Pairs of Ehrlichia chaffeensis Two-Component Regulatory System Proteins Involved in Inhibition of Lysosomal Fusion. Infect. Immun. 74:5014-5022.
124. Kume, N., M. I. Cybulsky, and M. A. Gimbrone, Jr. 1992. Lysophosphatidylcholine, a component of atherogenic lipoproteins, induces mononuclear leukocyte adhesion molecules in cultured human and rabbit arterial endothelial cells
2. J. Clin. Invest 90:1138-1144.
125. Kurahashi, K., O. Kajikawa, T. Sawa, M. Ohara, M. A. Gropper, D. W. Frank, T. R. Martin, and J. P. Wiener-Kronish. 1999. Pathogenesis of septic shock in Pseudomonas aeruginosa pneumonia
2. J. Clin. Invest 104:743-750.
126. Kurnasov, O., L. Jablonski, B. Polanuyer, P. Dorrestein, T. Begley, and A. Osterman. 2003. Aerobic tryptophan degradation pathway in bacteria: novel kynurenine formamidase
1. FEMS Microbiol. Lett. 227:219-227.
127. La, C. S., P. Geoffroy, H. Samaha, A. Ndiaye, G. Rahim, M. Legrand, and T. Heitz. 2005. A pathogen-inducible patatin-like lipid acyl hydrolase facilitates fungal and bacterial host colonization in Arabidopsis. Plant J. 44:810-825.
128. Ladant, D., S. Michelson, R. Sarfati, A. M. Gilles, R. Predeleanu, and O. Barzu. 1989. Characterization of the calmodulin-binding and of the catalytic domains of Bordetella pertussis adenylate cyclase
5. J. Biol. Chem. 264:4015-4020.
129. Laguna, R. K., E. A. Creasey, Z. Li, N. Valtz, and R. R. Isberg. 2006. A Legionella pneumophila-translocated substrate that is required for growth within macrophages and protection from host cell death
1. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 103:18745-18750.
130. Lebeau, I., E. Lammertyn, B. E. De, L. Maes, N. Geukens, M. L. Van, and J. Anne. 2004. Novel transcriptional regulators of Legionella pneumophila that affect replication in Acanthamoeba castellanii
4. Arch. Microbiol. 181:362-370.
131. Lee, C. Y. and E. A. Meighen. 1997. Cysteine-286 as the site of acylation of the Lux-specific fatty acyl-CoA reductase. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology 1338:215-222.

132. Lee, Y. A., M. Hendson, N. J. Panopoulos, and M. N. Schroth. 1994. Molecular cloning, chromosomal mapping, and sequence analysis of copper resistance genes from *Xanthomonas campestris* pv. *juglandis*: homology with small blue copper proteins and multicopper oxidase. *J. Bacteriol.* 176:173-188.
133. Lema, G., D. Dryja, I. Vargas, and G. Enhorning. 2000. *Pseudomonas aeruginosa* from patients with cystic fibrosis affects function of pulmonary surfactant
3. *Pediatr. Res.* 47:121-126.
134. Liberati, N. T., J. M. Urbach, S. Miyata, D. G. Lee, E. Drenkard, G. Wu, J. Villanueva, T. Wei, and F. M. Ausubel. 2006. An ordered, nonredundant library of *Pseudomonas aeruginosa* strain PA14 transposon insertion mutants
2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:2833-2838.
135. Liles, M. R., V. K. Viswanathan, and N. P. Cianciotto. 1998. Identification and temperature regulation of *Legionella pneumophila* genes involved in type IV pilus biogenesis and type II protein secretion
1. *Infect. Immun.* 66:1776-1782.
136. Liu, M., G. M. Conover, and R. R. Isberg. 2008. *Legionella pneumophila* EnhC is required for efficient replication in tumour necrosis factor alpha-stimulated macrophages
1. *Cell Microbiol.* 10:1906-1923.
137. Lucas, C. E., E. Brown, and B. S. Fields. 2006. Type IV pili and type II secretion play a limited role in *Legionella pneumophila* biofilm colonization and retention
1. *Microbiology* 152:3569-3573.
138. Luo, Z. Q. and R. R. Isberg. 2004. Multiple substrates of the *Legionella pneumophila* Dot/Icm system identified by interbacterial protein transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101:841-846.
139. Lynch, D., N. Fieser, K. Gloggler, V. Forsbach-Birk, and R. Marre. 2003. The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*
1. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:241-248.
140. Lynch, D., N. Fieser, K. Gloggler, V. Forsbach-Birk, and R. Marre. 2003. The response regulator LetA regulates the stationary-phase stress response in *Legionella pneumophila* and is required for efficient infection of *Acanthamoeba castellanii*
1. *FEMS Microbiol. Lett.* 219:241-248.
141. Machner, M. P. and R. R. Isberg. 2006. Targeting of Host Rab GTPase Function by the Intravacuolar Pathogen *Legionella pneumophila*. *Developmental Cell* 11:47-56.
142. Masamune, A., Y. Sakai, M. Yoshida, A. Satoh, K. Satoh, and T. Shimosegawa. 2001. Lysophosphatidylcholine activates transcription factor NF-kappaB and AP-1 in AR42J cells
1. *Dig. Dis. Sci.* 46:1871-1881.

143. Mauchline, W. S., R. Araujo, R. Wait, A. B. Dowsett, P. J. Dennis, and C. W. Keevil. 1992. Physiology and morphology of *Legionella pneumophila* in continuous culture at low oxygen concentration
2. J. Gen. Microbiol. 138:2371-2380.
144. Mauchline, W. S. and C. W. Keevil. 1991. Development of the BIOLOG substrate utilization system for identification of *Legionella* spp. Appl. Environ. Microbiol. 57:3345-3349.
145. May, C., R. Preisig-Müller, M. Hühne, P. Gnau, and H. Kindl. 1998. A phospholipase A2 is transiently synthesized during seed germination and localized to lipid bodies. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism 1393:267-276.
146. McGhie, E. J., R. D. Hayward, and V. Koronakis. 2001. Cooperation between actin-binding proteins of invasive *Salmonella*: SipA potentiates SipC nucleation and bundling of actin
1. EMBO J. 20:2131-2139.
147. McMorran, B., L. Town, E. Costelloe, J. Palmer, J. Engel, D. Hume, and B. Wainwright. 2003. Effector ExoU from the type III secretion system is an important modulator of gene expression in lung epithelial cells in response to *Pseudomonas aeruginosa* infection. Infect. Immun. 71:6035-6044.
148. Messerschmidt, A., R. Ladenstein, R. Huber, M. Bolognesi, L. Avigliano, R. Petruzzelli, A. Rossi, and A. Finazzi-Agrò. 1992. Refined crystal structure of ascorbate oxidase at 1.9 Å resolution. Journal of Molecular Biology 224:179-205.
149. Moffat, J. F., W. J. Black, and L. S. Tompkins. 1994. Further molecular characterization of the cloned *Legionella pneumophila* zinc metalloprotease
1. Infect. Immun. 62:751-753.
150. Molmeret, M., O. A. Alli, S. Zink, A. Flieger, N. P. Cianciotto, and Y. A. Kwaik. 2002. icmT is essential for pore formation-mediated egress of *Legionella pneumophila* from mammalian and protozoan cells
3. Infect. Immun. 70:69-78.
151. Molmeret, M., M. Santic', R. Asare, R. A. Carabeo, and K. Y. Abu. 2007. Rapid escape of the dot/icm mutants of *Legionella pneumophila* into the cytosol of mammalian and protozoan cells. Infect. Immun. 75:3290-3304.
152. Moraleda-Munoz, A. and L. J. Shimkets. 2007. Lipolytic Enzymes in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 189:3072-3080.
153. Mordue, D. G., C. F. Scott-Weathers, C. M. Tobin, and L. J. Knoll. 2007. A patatin-like protein protects *Toxoplasma gondii* from degradation in activated macrophages
2. Mol. Microbiol. 63:482-496.
154. Murata, T., A. Delprato, A. Ingmundson, D. K. Toomre, D. G. Lambright, and C. R. Roy. 2006. The *Legionella pneumophila* effector protein DrrA is a Rab1 guanine nucleotide-exchange factor
1. Nat. Cell Biol. 8:971-977.

155. **Murphy, D. J., J. N. Keen, J. N. O'Sullivan, D. M. Au, E. W. Edwards, P. J. Jackson, I. Cummins, T. Gibbons, C. H. Shaw, and A. J. Ryan. 1991. A class of amphipathic proteins associated with lipid storage bodies in plants. Possible similarities with animal serum apolipoproteins**
1. *Biochim. Biophys. Acta* 1088:86-94.
156. **Nagai, H., J. C. Kagan, X. Zhu, R. A. Kahn, and C. R. Roy. 2002. A bacterial guanine nucleotide exchange factor activates ARF on Legionella phagosomes.**
Science 295:679-682.
157. **Nagai, H. and C. R. Roy. 2001. The DotA protein from Legionella pneumophila is secreted by a novel process that requires the Dot/Icm transporter**
7. *EMBO J.* 20:5962-5970.
158. **Naglik, J. R., S. J. Challacombe, and B. Hube. 2003. Candida albicans secreted aspartyl proteinases in virulence and pathogenesis**
6. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 67:400-28, table.
159. **Nalefski, E. A., L. A. Sultzman, D. M. Martin, R. W. Kriz, P. S. Towler, J. L. Knopf, and J. D. Clark. 1994. Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A2, a regulatory Ca(2+)-dependent lipid-binding domain and a Ca(2+)-independent catalytic domain.** *J. Biol. Chem.* 269:18239-18249.
160. **Naylor, J. and N. P. Cianciotto. 2004. Cytochrome c maturation proteins are critical for in vivo growth of Legionella pneumophila.** *FEMS Microbiology Letters* 241:249-256.
161. **Neumeister, B., G. Reiff, M. Faigle, K. Dietz, H. Northoff, and F. Lang. 2000. Influence of Acanthamoeba castellanii on intracellular growth of different Legionella species in human monocytes**
5. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:914-919.
162. **Ninio, S. and C. R. Roy. 2007. Effector proteins translocated by Legionella pneumophila: strength in numbers.** *Trends Microbiol.* 15:372-380.
163. **Noll, F., C. May, and H. Kindl. 2000. Phospholipid monolayer of plant lipid bodies attacked by phospholipase A2 shows 80 nm holes analyzed by atomic force microscopy.** *Biophysical Chemistry* 86:29-35.
164. **Ochman, H., A. S. Gerber, and D. L. Hartl. 1988. Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction.** *Genetics* 120:621-623.
165. **Ohnishi, H., Y. Mizunoe, A. Takade, Y. Tanaka, H. Miyamoto, M. Harada, and S. i. Yoshida. 2004. Legionella dumoffii DjlA, a Member of the DnaJ Family, Is Required for Intracellular Growth.** *Infect. Immun.* 72:3592-3603.
166. **Pankhaniya, R. R., M. Tamura, L. R. Allmond, K. Moriyama, T. Ajayi, J. P. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 2004. Pseudomonas aeruginosa causes acute lung injury via the catalytic activity of the patatin-like phospholipase domain of ExoU**
1. *Crit Care Med.* 32:2293-2299.

167. Paul, R., S. Weiser, N. C. Amiot, C. Chan, T. Schirmer, B. Giese, and U. Jenal. 2004. Cell cycle-dependent dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel di-guanylate cyclase output domain
6. *Genes Dev.* 18:715-727.
168. Persson, B., M. Krook, and H. Jornvall. 1991. Characteristics of short-chain alcohol dehydrogenases and related enzymes. *Eur. J. Biochem.* 200:537-543.
169. Phillips, R. M., D. A. Six, E. A. Dennis, and P. Ghosh. 2003. In vivo phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU and protection of mammalian cells with phospholipase A2 inhibitors. *J. Biol. Chem.* 278:41326-41332.
170. Plekhanov, A. Y. 1999. Rapid staining of lipids on thin-layer chromatograms with amido black 10B and other water-soluble stains
1. *Anal. Biochem.* 271:186-187.
171. Polesky, A. H., J. T. D. Ross, S. Falkow, and L. S. Tompkins. 2001. Identification of *Legionella pneumophila* Genes Important for Infection of Amoebas by Signature-Tagged Mutagenesis. *Infect. Immun.* 69:977-987.
172. Prokazova, N. V., N. D. Zvezdina, and A. A. Korotaeva. 1998. Effect of lysophosphatidylcholine on transmembrane signal transduction
1. *Biochemistry (Mosc.)* 63:31-37.
173. Pukatzki, S., A. T. Ma, D. Sturtevant, B. Krastins, D. Sarracino, W. C. Nelson, J. F. Heidelberg, and J. J. Mekalanos. 2006. Identification of a conserved bacterial protein secretion system in *Vibrio cholerae* using the *Dictyostelium* host model system. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:1528-1533.
174. Rabin, S. D. and A. R. Hauser. 2005. Functional regions of the *Pseudomonas aeruginosa* cytotoxin ExoU
2. *Infect. Immun.* 73:573-582.
175. Rabin, S. D. P., J. L. Veesenmeyer, K. T. Biegling, and A. R. Hauser. 2006. A C-Terminal Domain Targets the *Pseudomonas aeruginosa* Cytotoxin ExoU to the Plasma Membrane of Host Cells. *Infect. Immun.* 74:2552-2561.
176. RACUSEN, D. A. V. I. and M. U. R. R. FOOTE. 1980. A MAJOR SOLUBLE GLYCOPROTEIN OF POTATO TUBERS1. *Journal of Food Biochemistry* 4:43-52.
177. Ricard, J., H. Pelloux, A. L. Favier, U. Gross, E. Brambilla, and P. mbroise-Thomas. 1999. *Toxoplasma gondii*: role of the phosphatidylcholine-specific phospholipase C during cell invasion and intracellular development
2. *Exp. Parasitol.* 91:231-237.
178. Robey, M., W. O'Connell, and N. P. Cianciotto. 2001. Identification of *Legionella pneumophila* rcp, a pagP-Like Gene That Confers Resistance to Cationic Antimicrobial Peptides and Promotes Intracellular Infection. *Infect. Immun.* 69:4276-4286.
179. Rodgers, F. G. 1979. Ultrastructure of *Legionella pneumophila*
7. *J. Clin. Pathol.* 32:1195-1202.

Referenzen

180. Rodgers, F. G. and M. R. Davey. 1982. Ultrastructure of the cell envelope layers and surface details of *Legionella pneumophila*
6. J. Gen. Microbiol. 128:1547-1557.
181. Rodgers, F. G. and F. C. Gibson, III. 1993. Opsonin-independent adherence and intracellular development of *Legionella pneumophila* within U-937 cells
2. Can. J. Microbiol. 39:718-722.
182. Rossier, O. and N. P. Cianciotto. 2001. Type II protein secretion is a subset of the PilD-dependent processes that facilitate intracellular infection by *Legionella pneumophila*
1. Infect. Immun. 69:2092-2098.
183. Rossier, O., J. Dao, and N. P. Cianciotto. 2008. The type II secretion system of *Legionella pneumophila* elaborates two aminopeptidases, as well as a metalloprotease that contributes to differential infection among protozoan hosts. Appl. Environ. Microbiol. 74:753-761.
184. Rossier, O., S. R. Starkenburg, and N. P. Cianciotto. 2004. *Legionella pneumophila* type II protein secretion promotes virulence in the A/J mouse model of Legionnaires' disease pneumonia
1. Infect. Immun. 72:310-321.
185. Rowbotham, T. J. 1980. Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33:1179-1183.
186. Rowbotham, T. J. 1986. Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. Isr. J. Med. Sci. 22:678-689.
187. Roy-Burman, A., R. H. Savel, S. Racine, B. L. Swanson, N. S. Revadigar, J. Fujimoto, T. Sawa, D. W. Frank, and J. P. Wiener-Kronish. 2001. Type III protein secretion is associated with death in lower respiratory and systemic *Pseudomonas aeruginosa* infections
2. J. Infect. Dis. 183:1767-1774.
188. Russel, M. 1998. Macromolecular assembly and secretion across the bacterial cell envelope: type II protein secretion systems
1. J. Mol. Biol. 279:485-499.
189. Rydel, T. J., J. M. Williams, E. Krieger, F. Moshiri, W. C. Stallings, S. M. Brown, J. C. Pershing, J. P. Purcell, and M. F. Alibhai. 2003. The crystal structure, mutagenesis, and activity studies reveal that patatin is a lipid acyl hydrolase with a Ser-Asp catalytic dyad. Biochemistry 42:6696-6708.
190. Ryjenkov, D. A., M. Tarutina, O. V. Moskvina, and M. Gomelsky. 2005. Cyclic diguanylate is a ubiquitous signaling molecule in bacteria: insights into biochemistry of the GGDEF protein domain. J. Bacteriol. 187:1792-1798.
191. Saliba, A. M., D. O. Nascimento, M. C. Silva, M. C. Assis, C. R. Gayer, B. Raymond, M. G. Coelho, E. A. Marques, L. Touqui, R. M. Albano, U. G. Lopes, D. D. Paiva, P. T. Bozza, and M. C. Plotkowski. 2005. Eicosanoid-mediated proinflammatory activity of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU. Cell Microbiol. 7:1811-1822.

Referenzen

192. Samuelsson, B., S. E. Dahlen, J. A. Lindgren, C. A. Rouzer, and C. N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects
1. *Science* 237:1171-1176.
193. Sandkvist, M. 2001. Type II secretion and pathogenesis
1. *Infect. Immun.* 69:3523-3535.
194. Sato, H., J. B. Feix, and D. W. Frank. 2006. Identification of superoxide dismutase as a cofactor for the pseudomonas type III toxin, ExoU. *Biochemistry* 45:10368-10375.
195. Sato, H., J. B. Feix, C. J. Hillard, and D. W. Frank. 2005. Characterization of phospholipase activity of the *Pseudomonas aeruginosa* type III cytotoxin, ExoU
3. *J. Bacteriol.* 187:1192-1195.
196. Sato, H. and D. W. Frank. 2004. ExoU is a potent intracellular phospholipase
1. *Mol. Microbiol.* 53:1279-1290.
197. Sato, H., D. W. Frank, C. J. Hillard, J. B. Feix, R. R. Pankhaniya, K. Moriyama, V. Finck-Barbancon, A. Buchaklian, M. Lei, R. M. Long, J. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 2003. The mechanism of action of the *Pseudomonas aeruginosa*-encoded type III cytotoxin, ExoU. *EMBO J.* 22:2959-2969.
198. Scherer, C. A., E. Cooper, and S. I. Miller. 2000. The *Salmonella* type III secretion translocon protein SspC is inserted into the epithelial cell plasma membrane upon infection
1. *Mol. Microbiol.* 37:1133-1145.
199. Scherer, G. F. 2002. Secondary messengers and phospholipase A2 in auxin signal transduction
1. *Plant Mol. Biol.* 49:357-372.
200. Scherer, G. F. and B. Andre. 1989. A rapid response to a plant hormone: auxin stimulates phospholipase A2 in vivo and in vitro
1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 163:111-117.
201. Schmiel, D. H. and V. L. Miller. 1999. Bacterial phospholipases and pathogenesis
2. *Microbes. Infect.* 1:1103-1112.
202. Schrag, J. D. and M. Cygler. 1997. Lipases and alpha/beta hydrolase fold
19. *Methods Enzymol.* 284:85-107.
203. Schulert, G. S., H. Feltman, S. D. Rabin, C. G. Martin, S. E. Battle, J. Rello, and A. R. Hauser. 2003. Secretion of the toxin ExoU is a marker for highly virulent *Pseudomonas aeruginosa* isolates obtained from patients with hospital-acquired pneumonia
2. *J. Infect. Dis.* 188:1695-1706.
204. Segal, G., M. Purcell, and H. A. Shuman. 1998. Host cell killing and bacterial conjugation require overlapping sets of genes within a 22-kb region of the *Legionella pneumophila* genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:1669-1674.

205. Segal, G., J. J. Russo, and H. A. Shuman. 1999. Relationships between a new type IV secretion system and the icm/dot virulence system of *Legionella pneumophila* 4. *Mol. Microbiol.* 34:799-809.
206. Segal, G. and H. A. Shuman. 1999. *Legionella pneumophila* Utilizes the Same Genes To Multiply within *Acanthamoeba castellanii* and Human Macrophages. *Infect. Immun.* 67:2117-2124.
207. Senda, K., H. Yoshioka, N. Doke, and K. Kawakita. 1996. A cytosolic phospholipase A2 from potato tissues appears to be patatin 1. *Plant Cell Physiol* 37:347-353.
208. Senior, P. J. and E. A. Dawes. 1973. The regulation of poly-beta-hydroxybutyrate metabolism in *Azotobacter beijerinckii* 11. *Biochem. J.* 134:225-238.
209. Shaver, C. M. and A. R. Hauser. 2004. Relative contributions of *Pseudomonas aeruginosa* ExoU, ExoS, and ExoT to virulence in the lung 3. *Infect. Immun.* 72:6969-6977.
210. Shewry, P. R. 2003. Tuber storage proteins 1. *Ann. Bot. (Lond)* 91:755-769.
211. Shohdy, N., J. A. Efe, S. D. Emr, and H. A. Shuman. 2005. Pathogen effector protein screening in yeast identifies *Legionella* factors that interfere with membrane trafficking. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 102:4866-4871.
212. Sitkiewicz, I., M. J. Nagiec, P. Sumby, S. D. Butler, C. Cywes-Bentley, and J. M. Musser. 2006. Emergence of a bacterial clone with enhanced virulence by acquisition of a phage encoding a secreted phospholipase A2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 103:16009-16014.
213. Sitkiewicz, I., K. E. Stockbauer, and J. M. Musser. 2007. Secreted bacterial phospholipase A2 enzymes: better living through phospholipolysis. *Trends in Microbiology* 15:63-69.
214. Smith, G. A., H. Marquis, S. Jones, N. C. Johnston, D. A. Portnoy, and H. Goldfine. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread 1. *Infect. Immun.* 63:4231-4237.
215. Songer, J. G. 1997. Bacterial phospholipases and their role in virulence 7. *Trends Microbiol.* 5:156-161.
216. Stirling, F. R., A. Cuzick, S. M. Kelly, D. Oxley, and T. J. Evans. 2006. Eukaryotic localization, activation and ubiquitinylation of a bacterial type III secreted toxin. *Cell Microbiol.* 8:1294-1309.
217. Stone, B. J. and Y. A. Kwaik. 1999. Natural competence for DNA transformation by *Legionella pneumophila* and its association with expression of type IV pili 2. *J. Bacteriol.* 181:1395-1402.

218. Strickland, J. A., G. L. Orr, and T. A. Walsh. 1995. Inhibition of *Diabrotica* Larval Growth by Patatin, the Lipid Acyl Hydrolase from Potato Tubers
3. *Plant Physiol* 109:667-674.
219. Sturgill-Koszycki, S. and M. S. Swanson. 2000. *Legionella pneumophila* replication vacuoles mature into acidic, endocytic organelles. *J. Exp. Med.* 192:1261-1272.
220. Swanson, M. S. and R. R. Isberg. 1995. Association of *Legionella pneumophila* with the macrophage endoplasmic reticulum. *Infect. Immun.* 63:3609-3620.
221. Tamura, M., T. Ajayi, L. R. Allmond, K. Moriyama, J. P. Wiener-Kronish, and T. Sawa. 2004. Lysophospholipase A activity of *Pseudomonas aeruginosa* type III secretory toxin ExoU. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 316:323-331.
222. Terebiznik, M. R., O. V. Vieira, S. L. Marcus, A. Slade, C. M. Yip, W. S. Trimble, T. Meyer, B. B. Finlay, and S. Grinstein. 2002. Elimination of host cell PtdIns(4,5)P(2) by bacterial SigD promotes membrane fission during invasion by *Salmonella*
1. *Nat. Cell Biol.* 4:766-773.
223. Thomas, V., T. Bouchez, V. Nicolas, S. Robert, J. F. Loret, and Y. Levi. 2004. Amoebae in domestic water systems: resistance to disinfection treatments and implication in *Legionella* persistence
1. *J. Appl. Microbiol.* 97:950-963.
224. Thompson, J. D., F. Plewniak, J. Thierry, and O. Poch. 2000. DbClustal: rapid and reliable global multiple alignments of protein sequences detected by database searches
1. *Nucleic Acids Res.* 28:2919-2926.
225. Tilney, L. G., O. S. Harb, P. S. Connelly, C. G. Robinson, and C. R. Roy. 2001. How the parasitic bacterium *Legionella pneumophila* modifies its phagosome and transforms it into rough ER: implications for conversion of plasma membrane to the ER membrane
2. *J. Cell Sci.* 114:4637-4650.
226. Tjalsma, H., A. Bolhuis, J. D. H. Jongbloed, S. Bron, and J. M. van Dijk. 2000. Signal Peptide-Dependent Protein Transport in *Bacillus subtilis*: a Genome-Based Survey of the Secretome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64:515-547.
227. Upton, C. and J. T. Buckley. 1995. A new family of lipolytic enzymes?
2. *Trends Biochem. Sci.* 20:178-179.
228. VanRheenen, S. M., Z. Q. Luo, T. O'Connor, and R. R. Isberg. 2006. Members of a *Legionella pneumophila* family of proteins with ExoU (phospholipase A) active sites are translocated to target cells. *Infect. Immun.* 74:3597-3606.
229. Vasil, M. L., L. M. Graham, R. M. Ostroff, V. D. Shortridge, and A. I. Vasil. 1991. Phospholipase C: molecular biology and contribution to the pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa*
7. *Antibiot. Chemother.* 44:34-47.

Referenzen

230. Viswanathan, V. K., S. Kurtz, L. L. Pedersen, Y. bu Kwaik, K. Krcmarik, S. Mody, and N. P. Cianciotto. 2002. The Cytochrome c Maturation Locus of *Legionella pneumophila* Promotes Iron Assimilation and Intracellular Infection and Contains a Strain-Specific Insertion Sequence Element. *Infect. Immun.* 70:1842-1852.
231. Vogel, J. P., H. L. Andrews, S. K. Wong, and R. R. Isberg. 1998. Conjugative transfer by the virulence system of *Legionella pneumophila*. *Science* 279:873-876.
232. von, B. H., S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, and C. Luck. 2008. Community-acquired *Legionella pneumonia*: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia 1. *Clin. Infect. Dis.* 46:1356-1364.
233. Warren, W. J. and R. D. Miller. 1979. Growth of Legionnaires disease bacterium (*Legionella pneumophila*) in chemically defined medium. *J. Clin. Microbiol.* 10:50-55.
234. Zhuang, Z., F. Song, H. Zhao, L. Li, J. Cao, E. Eisenstein, O. Herzberg, and D. Dunaway-Mariano. 2008. Divergence of function in the hot dog fold enzyme superfamily: the bacterial thioesterase YciA. *Biochemistry* 47:2789-2796.

7. Anhang

Tab. S1: Neue putative *L. pneumophila* Wirtszellkolonisationsgene, die im Scatterscreen identifiziert wurden. *KD=konservierte Proteindomänen # putative Proteinfunktion, Schlüssel untenstehend (<http://cmr-tigr.org>), Homologe und e-values wurden vom Blast Algorithmus ausgegeben (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

ID	Gen	gi	Name	putative KDs* Superfamilie	Nächstes Homolog	e-value
D31 D24	<i>lpg0026</i> <i>lpc0027</i> <i>lpp0026</i> <i>lpl0027</i>	52840282	amino acid permease	AA-permease	amino acid permease [<i>Cellvibrio japonicus</i> Ueda107]	5,00E-132
A4	<i>lpg0072</i> <i>lpc0094</i> <i>lpp0086</i> <i>lpl0074</i>	52840327	excinuclease ABC subunit B	ABC_ATPase, HELICc, UVR	Excinuclease ABC subunit B [<i>Pseudomonas mendocina ymp</i>]	0.0
D18 D84	<i>lpg0129</i> <i>lpc0128</i> <i>lpp0143</i> <i>lpl0128</i>	52840384	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	LuxC	methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase [<i>Aeromonas salmonicida</i>]	1E-164
D36	<i>lpg0166</i> <i>lpc0247</i> <i>lpp0228</i> <i>lpl0229</i>	52840421	hypothetical protein	DUF808	putative membrane protein [<i>Acinetobacter baumannii</i>]	2E-83
D6	<i>lpg0200</i> <i>lpc0275</i> <i>lpp0260</i> <i>lpl0255</i>	52840455	cytochrome D ubiquinol oxidase subunit II	Cyto_ox_2	cytochrome D ubiquinol oxidase, subunit II [<i>Rickettsiella grylli</i>]	1E-100
D71	<i>lpg0230</i> <i>lpc0305</i> <i>lpp0293</i> <i>lpl0283</i>	52840485	PleD, sensor histidine kinase	GGDEF, Chase3	PleD-like protein [<i>Synechocystis sp.</i>]	8E-79
A22	<i>lpg0233</i> <i>lpc0308</i> <i>lpp-</i> <i>lpl-</i>	52840488	benzoylformate decarboxylase	TTP_Enzymes	thiamine pyrophosphate protein TPP binding domain protein [<i>Methylobacterium extorquens</i> PA1]	2E-71
D85	<i>lpg0237</i> <i>lpc0313</i> <i>lpp0307</i> <i>lpl0291</i>	52840492	lipolytic enzyme	Esterase_Lipase Superfamily	lipolytic enzyme [<i>Nodularia spumigena</i> CCY9414]	2E-45

Anhang

D79	<i>lpg0243</i> <i>lpc0320</i> <i>lpp0313</i> <i>lpl0297</i>	52840498	short chain dehydrogenase	AdoHcyase	probable short-chain dehydrogenase [<i>Pseudomonas</i> <i>aeruginosa</i> PA7]	6E-68
D62	<i>lpg0265</i> <i>lpc0341</i> <i>lpp0339</i> <i>lpl0317</i>	52840520	multicopper oxidase		putative multicopper oxidase [<i>Methylobacterium</i> <i>nodulans</i> ORS 2060]	4E-90
D17	<i>lpg0277</i> <i>lpc0354</i> <i>lpp0352</i> <i>lpl0329</i>	52840532	LssE, sensory box protein, GGDEF family protein	GGDEF, EAL, REC	hypothetical protein BuboB_27536 [<i>Burkholderia</i> <i>ubonensis</i> Bu]	1,00E-153
A29 A30	<i>lpg0493</i> <i>lpc0531</i> <i>lpp-</i> <i>lpl -</i>	52840738	amino acid (glutamine) ABC transporter, ATP binding component	ABC_ATPase	amino acid ABC transporter, ATP- binding protein [<i>Wolbachia</i> endosymbiont of <i>Drosophila</i> <i>ananassae</i>]	5E-67
D94	<i>lpg0515</i> <i>lpc2829</i> <i>lpp0578</i> <i>lpl0554</i>	52840760	phytanoyl-CoA dioxygenase	PhyH Superfamily	hypothetical protein FG10257.1 [<i>Gibberella zeae</i> PH-1]	2e-28
D44	<i>lpg0549</i> <i>lpc2751</i> <i>lpp0610</i> <i>lpl0591</i>	52840792	gamma- glutamyltranspeptidase	G_glu_transpeptidase	gamma- glutamyltranspeptidase [Methylococcus <i>capsulatus</i> str. Bath]	4E-150
D4	<i>lpg0599</i> <i>lpc2700</i> <i>lpp0650</i> <i>lpl0634</i>	52840836	poly-beta- hydroxybutyrate polymerase	PhaC_N, Esterase_lipase	putative poly-beta- hydroxybutyrate synthase [<i>Azoarcus</i> sp. EbN1]	5E-166
A8	<i>lpg0618</i> <i>lpc2676</i> <i>lpp0672</i> <i>lpl0656</i>	52840855	3-methyladenine DNA glycosylase	Adenine_glyco	probable 3- methyladenine-DNA glycosylase I [<i>Candidatus</i> <i>Protochlamydia</i> <i>amoebophila</i> UWE25]	2E-66
D37	<i>lpg0635</i> <i>lpc2659</i> <i>lpp0689</i> <i>lpl0672</i>	52840872	melitin resistance protein	PMT	probable melitin resistance protein [<i>Chromobacterium</i> <i>violaceum</i>]	0.0

Anhang

A27	<i>lpg0641</i> <i>lpc2652</i> <i>lpp0695</i> <i>lpl0678</i>	52840878	ATP-dependent protease ATP- binding subunit	ABC_ATPase	heat shock protein HslVU, ATPase subunit HslU [<i>Hahella chejuensis</i>]	0.0
D3	<i>lpg0685</i> <i>lpc2609</i> <i>lpp0740</i> <i>lpl0721</i>	52840922	Fe-S oxidoreductase	UPF0004, Radical_SAM	hypothetical protein Nmuf_A1979 [<i>Nitrospira multiformis</i>]	2E- 171
D7	<i>lpg1019</i> <i>lpc2261</i> <i>lpp2362</i> <i>lpl2064</i>	52841253	chemiosmotic efflux system B protein B	PRK11578	heavy metal RND efflux membrane fusion protein, CzcB family [<i>Pseudomonas stutzeri</i>]	2E-71
D91	<i>lpg1110</i> <i>lpc2142</i> <i>lpp1111</i> <i>lpl1114</i>	52841344	hypothetical protein	-	hypothetical protein MUL_1771 [<i>Mycobacterium ulcerans</i> Agy99]	3.7
A16	<i>lpg1121</i> <i>lpc0578</i> <i>lpp1121</i> <i>lpl1126</i>	52841355	hypothetical protein	-	Putative ribosomal RNA small subunit methyltransferase D [<i>Pseudoalteromonas tunicata</i> D2]	1.5
D52	<i>lpg1146</i> <i>lpc0609</i> <i>lpp1148</i> <i>lpl1152</i>	52841380	thermostable carboxypeptidase 1	Peptidase_M32	Zn-dependent carboxypeptidase [<i>Yersinia frederiksenii</i>]	5,00E -131
D28	<i>lpg1188</i> <i>lpc0655</i> <i>lpp1190</i> <i>lpl1196</i>	52841421	Kup system potassium uptake protein	Kup	potassium uptake protein, Kup system [<i>Geobacter sulfurreducens</i>]	8E- 147
PH2	<i>lpg1349</i> <i>lpc0765</i> <i>lpp1303</i> <i>lpl1302</i>	52841579	apolipoprotein N- acyltransferase	CN_hydrolase	apolipoprotein N- acyltransferase [<i>Rickettsiella grylli</i>]	9,00E -83
D65	<i>lpg1373</i> <i>lpc0789</i> <i>lpp1327</i> <i>lpl1324</i>	52841603	ribonuclease HII	RNase_HII	Ribonuclease HII [<i>Haemophilus ducreyi</i>]	2E-59
A14	<i>lpg1376</i> <i>lpc0792</i> <i>lpp1331</i> <i>lpl1327</i>	52841606	hypothetical protein	DUF163	hypothetical protein MED92_07681 [<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92]	2,00E -42
D81	<i>lpg1426</i> <i>lpc0842</i>	52841656	hypothetical protein	Patatin	hypothetical protein	2,00E

Anhang

	<i>lpp1381</i> <i>lpl1377</i>				RT0522 [<i>Rickettsia typhi</i> str. Wilmington]	-17
D82	<i>lpg1441</i> <i>lpc0857</i> <i>lpp1396</i> <i>lpl1600</i>	52841672	metal dependent phosphoesterase	POLIII _{Ac}	putative metal dependent phosphoesterase [marine gamma proteobacterium HTCC2207]	6,00E-58
A19	<i>lpg1466</i> <i>lpc0881</i> <i>lpp1422</i> <i>lpl1562</i>	52841696	hypothetical protein	DUF1342	hypothetical protein Rfer_2906 [<i>Rhodospirillum rubrum</i> T118]	1,00E-21
D13	<i>lpg1469</i> <i>lpc0884</i> <i>lpp1425</i> <i>lpl1559</i>	52841700	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase	Peptidase_S13	peptidase S13 D-Ala-D-Ala carboxypeptidase C [<i>Burkholderia phytofirmans</i> PsJN]	7,00E-154
D19 D78	<i>lpg1507</i> <i>lpc0926</i> <i>lpp1464</i> <i>lpl1519</i>	52841737	sodium/hydrogen antiporter	Na-H Exchanger Superfamily	sodium/hydrogen antiporter family protein [<i>Coxiella burnetii</i> RSA 493]	1,00E-116
D38	<i>lpg1596</i> <i>lpc1023</i> <i>lpp1554</i> <i>lpl1429</i>	52841826	enoyl CoA hydratase	ECH, Adohcyase, 3HCDH	putative fatty oxidation complex, alpha subunit [<i>Coxiella burnetii</i> Dugway 5J108-111]	0.0
D61	<i>lpg1610</i> <i>lpc1036</i> <i>lpp1575</i> <i>lpl1414</i>	52841838	gamma-glutamyl kinase	AAK, PUA	Glutamate 5-kinase, ProB-related [<i>Prosthecochloris aestuarii</i> DSM 271]	5,00E-69
D86	<i>lpg1615</i> <i>lpc1042</i> <i>lpp1585</i> <i>lpl1408</i>	52841843	multidrug resistance ABC transporter ATP binding protein	P-loop_NTPase Superfamily	ABC-type multidrug transport system, ATPase component [<i>Rickettsia bellii</i> OSU 85-389]	6e-142
D54	<i>lpg1634</i> <i>lpc1663</i> <i>lpp1604</i> <i>lpl-</i>	52841862	oxidase	FAD_binding_4 FAD_oxidase_C	FAD linked oxidase domain protein [<i>Cyanothece sp.</i> PCC 8801]	0.0
D58	<i>lpg1638</i> <i>lpc1067</i> <i>lpp1608</i> <i>lpl1388</i>	52841866	drug:proton antiporter	-	integral membrane protein [<i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2)]	6,00E-78

Anhang

A26	<i>lpg1653</i> <i>lpc1083</i> <i>lpp1624</i> <i>lpl1619</i>	52841881	D-xylose-proton symporter	Sugar Tr Superfamily	D-xylose-proton symporter [<i>Rickettsiella grylli</i>]	4,00E-81
D66	<i>lpg1665</i> <i>lpc1095</i> <i>lpp1636</i> <i>lpl1630</i>	52841893	hypothetical protein	A2M_N_2, Isopren_C2_like	alpha-2-macroglobulin domain protein [<i>Burkholderia cenocepacia</i> MC0-3]	0.0
D59	<i>lpg1702</i> <i>lpc1452</i> <i>lpp1667</i> <i>lpl1661</i>	52841930	hypothetical protein	mukB multi-Domain	kinectin 1 (kinesin receptor) [<i>Legionella pneumophila</i> Philadelphia 1]	1e-61
D8	<i>lpg1762</i> <i>lpc1203</i> <i>lpp1726</i> <i>lpl1726</i>	52841989	sigma 54-dependent response regulator	Rec, ABC ATPase	two-component response regulator [<i>Oceanospirillum</i> sp. MED92]	5,00E-138
D70	<i>lpg1805</i> <i>lpc1294</i> <i>lpp1768</i> <i>lpl1769</i>	52842032	DNA mismatch repair protein	ABC_ATPase, MutSI, MutSII, MutSIII	DNA mismatch repair protein MutS [<i>Coxiella burnetii</i>]	0.0
D27	<i>lpg1843</i> <i>lpc1288</i> <i>lpp1807</i> <i>lpl1808</i>	52842070	proline iminopeptidase	Esterase_Lipase Superfamily	Peptidase S33, proline iminopeptidase 1 [marine gamma proteobacterium HTCC2143]	2,00E-99
A23	<i>lpg1925</i> <i>lpc1379</i> <i>lpp1900</i> <i>lpl1889</i>	52842143	hypothetical protein	-	AGAP008736-PA [<i>Anopheles gambiae</i> str. PEST]	0.28
D63	<i>lpg1974</i> <i>lpc1461</i> <i>lpp1958</i> <i>lpl1952</i>	52842191	major outer membrane protein	<i>Legionella</i> OMP	hypothetical protein Pcar_0519 [<i>Pelobacter carbinolicus</i> DSM 2380]	2,00E-11
A21	<i>lpg2011</i> <i>lpc1495</i> <i>lpp1993</i> <i>lpl1988</i>	52842228	stress induced hypothetical protein	DUF1732, YicC-N	hypothetical protein Noc_0956 [<i>Nitrosococcus oceani</i> ATCC 19707]	2,00E-65
D88	<i>lpg2031</i> <i>lpc1515</i> <i>lpp2013</i> <i>lpl2008</i>	52842248	arginyl-tRNA synthetase	-	arginyl-tRNA synthetase [<i>Methylococcus capsulatus</i> str. Bath]	0.0

Anhang

D41	<i>lpg2032</i> <i>lpc1516</i> <i>lpp2014</i> <i>lpl2009</i>	52842249	transporter, permease	-	hypothetical protein SIAM614_20101 [<i>Stappia aggregata</i> IAM 12614]	3,00E -59
D67	<i>lpg2132</i> <i>lpc1579</i> <i>lpp2071</i> <i>lpl2061</i>	52842346	sensory box/GGDEF family protein	GGDEF, PAS	diguanylate cyclase/phosphodiesterase with PAS/PAC sensor(s)[<i>Desulfuromonas acetoxidans</i> DSM 684]	3e-63
D87	<i>lpg2257</i> <i>lpc1726</i> <i>lpp2211</i> <i>lpl2183</i>	52842470	hypothetical protein	-	hypothetical protein B14911_25090 [<i>Bacillus sp.</i> NRRL B-14911]	4,00E -05
D12	<i>lpg2316</i> <i>lpc1783</i> <i>lpp2264</i> <i>lpl2236</i>	52842526	3-hydroxybutyrate dehydrogenase	AdoHcyase	3-hydroxybutyrate dehydrogenase [<i>Delftia acidovorans</i> SPH-1]	1,00E -112
D30	<i>lpg2339</i> <i>lpc1807</i> <i>lpp2287</i> <i>lpl2260</i>	52842549	hypothetical protein	-	conserved hypothetical protein [<i>Mycobacterium</i> <i>marinum</i> M]	5,00E -35
D60	<i>lpg2401</i> <i>lpc2077</i> <i>lpp2446</i> <i>lpl2324</i>	52842610	putative secreted esterase	Beta-Lactamase	beta-lactamase [<i>Flavobacterium</i> <i>johnsoniae</i> UW101]	3,00E -15
D51	<i>lpg2409</i> <i>lpc2067</i> <i>lpp2476</i> <i>lpl2332</i>	52842618	hypothetical protein	-	rab GDP dissociation inhibitor beta, putative [Plasmodium <i>vivax</i> SaI-1]	1.9
D77 D75	<i>lpg2494</i> <i>lpc1980</i> <i>lpp2561</i> <i>lpl2415</i>	52842702	hypothetical protein	Cyclase	Kynurenine formamidase [<i>Methylokoris</i> <i>inferorum</i> V4]	1,00E -25
A15	<i>lpg2522</i> <i>lpc1948</i> <i>lpp2590</i> <i>lpl2444</i>	52842730	metal-activated pyridoxal enzyme	Ala_racemase	metal-activated pyridoxal enzyme [<i>Moritella sp.</i> PE36]	1,00E -99
D56	<i>lpg2527</i> <i>lpc1944</i> <i>lpp2592</i> <i>lpl2447</i>	52842735	hypothetical protein with coiled coil domain	-	TBC1 domain family, member 2B [Macaca <i>mulatta</i>]	2.8
A3	<i>lpg2538</i> <i>lpc1930</i> <i>lpp2604</i>	52842746	hypothetical protein	-	putative ATP synthase A chain [<i>Polaribacter irgensii</i>]	0.74

Anhang

	<i>lpl2459</i>				23-P]	
PH3	<i>lpg2544</i> <i>lpc1924</i> <i>lpp2611</i> <i>lpl2466</i>	52842752	membrane-bound lytic murein transglycosylase	MltA, 3D	transglycosylase, putative [<i>Desulfovibrio</i> <i>desulfuricans</i> G20]	7,00E -23
A2	<i>lpg2577</i> <i>lpc1924</i> <i>lpp2611</i> <i>lpl2466</i>	52842783	hypothetical protein	-	Alpha,alpha- trehalose-phosphate synthase (UDP- forming) [<i>Rhodospirillum</i> <i>ferrireducens</i> T118]	1.3
D42	<i>lpg2680</i> <i>lpc0457</i> <i>lpp2734</i> <i>lpl2607</i>	52842886	UDP-N- acetylmuramyl tripeptide synthase	DALA_DALA_ Lig_C	cyanophycin synthetase [<i>Clostridium</i> <i>thermocellum</i> ATCC 27405]	2,00E -37
D29	<i>lpg2806</i> <i>lpc3092</i> <i>lpp2853</i> <i>lpl2721</i>	52843002	hypothetical protein	-	DHHC zinc finger domain containing protein [<i>Tetrahymena</i> <i>thermophila</i> SB210]	3.5
D64	<i>lpg2814</i> <i>lpc3100</i> <i>lpp2866</i> <i>lpl2729</i>	52843010	aminopeptidase	M20_dimer	leucine aminopeptidase, putative [<i>Burkholderia</i> <i>thailandensis</i> TXDOH]	1,00E -52
D9	<i>lpg2815</i> <i>lpc3100</i> <i>lpp2866</i> <i>lpl2729</i>	52843011	hypothetical protein	-	putative membrane protein [<i>Rickettsiella</i> <i>grylli</i>]	4,00E -34
A6 A7	<i>lpg2832</i> <i>lpc3116</i> <i>lpp2889</i> <i>lpl2744</i>	52843028	hypothetical protein	-	hypothetical protein Mmc1_1487 [<i>Magnetococcus</i> sp. MC-1]	2,00E -21
D92	<i>lpg2835</i> <i>lpc3119</i> <i>lpp2892</i> <i>lpl2747</i>	52843031	thiopurine S- methyltransferase	Methyltransf_1 1	thiopurine S- methyltransferase [<i>Shewanella baltica</i> OS155]	3,00E -37
D80	<i>lpg2870</i> <i>lpc3156</i> <i>lpp2929</i> <i>lpl2783</i>	52843065	hypothetical protein	DUF81	hypothetical protein PE36_07941 [<i>Moritella</i> sp. PE36]	1,00E -39
D76	<i>lpg2885</i> <i>lpc3171</i> <i>lpp2944</i>	52843080	hypothetical protein	-	hypothetical protein HPS_11472	0.26

Anhang

	<i>lpl2798</i>				<i>[Haemophilus parasuis 29755]</i>	
D95	<i>lpg2917</i> <i>lpc3225</i> <i>lpp-</i> <i>lpl2845</i>	52843111	hypothetical protein	GltD Multidomain	Conserved hypothetical protein <i>[Mycobacterium abscessus]</i>	2,00E-91
D83	<i>lpg2996</i> <i>lpc3311</i> <i>lpp3067</i> <i>lpl2924</i>	52843189	tetrapyrrole (corrin/porphyrin) methylase	-	predicted methyltransferase <i>[Hahella chejuensis</i> KCTC 2396]	1,00E-72

Farbcode	Putative Proteinfunktion
	Zellhülle, Biosynthese & Degradation, Struktur
	Proteinschicksal, Modifizierung, Sekretion, Degradation
	Energiestoffwechsel
	DNA Metabolismus
	Regulation
	Protein Synthese
	Transport und Bindung von Proteinen
	Aminosäure Biosynthese
	zelluläre Prozesse, Detoxifizierung, Adaptation an atypische Bedingungen
	Fettsäure- und Phospholipidstoffwechsel
	Biosynthese von Cofaktoren, Transportern,
	Purin-, Pyrimidin-, Nukleosid-, Nukleotidstoffwechsel
	unbekannte Funktion
	konserviert, hypothetisch
	unklassifiziert

8. Publikationsliste

Forschungsartikel

Aurass P, Pless B, Rydzewski K, Holland G, Bannert N, and Flieger A. *bdhA-patD* Operon as a Virulence Determinant, Revealed by a Novel Large-Scale Approach for Identification of *Legionella pneumophila* Mutants Defective for Amoeba Infection. *Applied and Environmental Microbiology*, July 2009, p. 4506–4515

Banerji B, **Aurass P**, Flieger A. The manifold phospholipases A of *Legionella pneumophila* – Identification, export, regulation and their link to virulence. *International Journal of Medical Microbiology*. 2008 Apr; 298(3-4):169-81.

Aurass P, Banerji S, Flieger A. Loss of the *Legionella pneumophila* type IV secreted patatin-like effector PatA/VipD causes avirulence in amoeba and macrophage infection models. *Legionella*, 2006, 199-202.

Konferenzpräsentationen

Busse S, Marquardt M, **Aurass P**, Possling A, Flieger A, and Hengge R. Phospholipase-mediated signaling in the stress response network of *E. coli*. Poster auf dem dritten internationalen Symposium des "DFG Priority Program SPP 1132", "Proteolysis in Prokaryotes: Protein Quality Control and Regulatory Principles", 2008, Berlin

Busse S, Marquardt M, **Aurass P**, Poßling A, Flieger A, Hengge R. Phospholipase-mediated signaling in the stress response network of a bacterium. Vortrag auf der VAAM Jahrestagung, 2008, Frankfurt

Aurass P, Pless B, Rydzewski K, Flieger A. New *Legionella pneumophila* genes essential for amoeba colonization. Vortrag auf der DGHM Jahrestagung, 2007, Göttingen

Aurass P, Banerji S, Flieger A. Patatin-like Proteins of *Legionella pneumophila* - novel factors in bacterium-host interplay. Poster auf der VAAM Jahrestagung, 2007, Osnabrück

Siegbrecht E, Pless B, **Aurass P**, Flieger A. Identification and virulence properties of novel *Legionella* proteins contributing to lipolysis and proteolysis. Poster auf der VAAM Jahrestagung, 2007, Osnabrück

Aurass P, Banerji S, Flieger A. Patatin-like proteins of *Legionella pneumophila*. Vortrag im Symposium "Pathogenicity Mechanisms of *Pseudomonas* and *Legionella* - Hydrolytic Enzymes their Secretion and Regulatory Mechanisms", 2006, CNRS Marseille, Frankreich

Aurass P, Banerji S, Flieger A. Loss of a patatin-like phospholipase A causes reduced infectivity of *Legionella pneumophila* in amoeba and macrophage infection models. Poster auf dem "6th International Meeting on *Legionella*", 2005, Chicago, USA

Lottmann J, **Aurass P**, Götz M, Smalla K, Berg G. Plant or soil?: Analysis of the influence on rhizosphere associated antagonistic microorganisms. Poster auf der VAAM Jahrestagung 2003, Berlin

9. Danksagung

Bei PD Dr. Flieger bedanke ich mich sehr herzlich für die Möglichkeit an dem spannenden Arbeitsgebiet der *Legionella*-Forschung teilhaben zu können. Ihre zahlreichen fachlichen Anregungen und Diskussionen haben sehr zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen.

Herrn Prof. Schneider danke ich sehr für die Betreuung und die Beratung während der Promotion, insbesondere in der Abschlussphase.

Ich danke ausserdem allen Kooperationspartnern, die zum Erfolg dieser Arbeit beigetragen haben, herzlich: Dr. Helbig und Frau Gäbler (TU-Dresden), Prof. Schade (Charité Berlin), Dr. Denner und Frau Klein (Robert Koch-Institut) waren massgeblich an der Herstellung der PatA spezifischen Antikörper beteiligt.

Den Mitarbeitern vom ZBS4 des Robert Koch-Instituts, insbesondere Frau Holland, Dr. Madela, Dr. Laue und Dr. Bannert danke ich für die vielgestaltige Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Mikroskopie.

Mein großer Dank gilt ausserdem Frau Stämmeler, Dr. Lasch und Prof. Naumann vom Robert Koch-Institut, welche die FTIR Analysen durchgeführt haben.

Mein besonderer Dank gilt der ehemaligen Diplomandin Birgit Pless sowie Kerstin Ryzewski für ihre hervorragende Mitarbeit am Scatterscreen-Projekt.

Allen anderen ehemaligen und rezenten Mitarbeitern der NG5/FG11 möchte ich ganz herzlich für die gute Arbeitsatmosphäre und die konstruktive Zusammenarbeit in unserem Labor danken: Sangeeta Banerji, Jenny Bender, Markus Broich, Björn Hermes, Steffi Klar, Elena Rastew, Silke Tröller und Sven Volkmar. Mein spezieller Dank gilt hierbei Enrico Siegbrecht, der viele Stunden am Massespektrometer zugebracht hat um "interessante Banden" zu identifizieren.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während der gesamten Arbeit und vor allem im Jahr 2008 während der Abschlussphase sehr unterstützt hat.